ANNALES
DE
L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
VERSAILLES

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

ANNALES DE L'INSTITUT NATIONAL
DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE

SÉRIE E

ANNALES
DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

CONSERVATION ET TRANSFORMATION
DES PRODUITS AGRICOLES

Année 1958

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, rue Keppler – Paris

SUBSTANCES COLLOÏDALES DES JUS DE RAISIN INFLUENCE DES DIFFÉRENTS MODES DE CONSERVATION SUR LEUR STABILITÉ

PAR

L. DEIBNER, H. RIFAI [1], **M. FLANZY**

Station Centrale de Technologie
des Produits Végétaux, Narbonne.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — **Introduction.**
II. — **Données actuelles sur les colloïdes des jus de raisin et des vins.**
III. — **Recherches personnelles sur les colloïdes des jus de raisin.**
A. — Leur objet.
B. — Méthodes de dosage.
C. — Caractéristiques des jus utilisés.
D. — Résultats obtenus, leur discussion.
IV. — **Conclusion.**
Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Les substances colloïdales des jus de raisin et également des vins sont peu étudiées au point de vue qualitatif et quantitatif. D'une façon générale, elles se composent de pectines, de gommes, de mucilages (dextrane), de colorants, de tannins, de protéides et de leurs produits de dégradation, de sels minéraux.

Présentes en quantité élevée, les substances colloïdales constituent un grand inconvénient par leur influence sur la qualité et la stabilité des jus et des vins. Par contre, à dose convenable, elles augmentent non seulement la valeur nutritionnelle de ces boissons, mais également jouent un rôle non négligeable dans le bilan des substances responsables de leurs propriétés organoleptiques.

La composition chimique des colloïdes, le degré de leur dispersion et de réversibilité subissent des modifications plus ou moins profondes au cours de l'élaboration et de la conservation des jus de raisin en fonction

[1] Stagiaire de l'Institut Français de Coopération Technique.

des températures, des réactions d'oxydation, des modes de traitement et de leur durée.

De telles modifications sont très souvent accompagnées de la formation d'autres colloïdes, donnant lieu à des troubles et en tout cas ne possédant pas les qualités des colloïdes natifs. Dans ces conditions, il serait imprudent de rechercher la limpidité parfaite des jus et de négliger les précautions utiles à l'intégrité de leur composition naturelle. Pour réussir dans cette voie, la connaissance des propriétés des colloïdes des jus de raisin est indispensable.

II. — DONNÉES ACTUELLES SUR LES COLLOIDES DES JUS DE RAISIN ET DES VINS

L'étude des colloïdes des raisins, de leurs jus et des vins a débuté par les recherches sur leurs deux composants : les gommes et les pectines.

La présence des gommes dans le raisin et le vin a été signalée par PASTEUR (1), NIVIÈRE et HÉBERT (2), CAMBONI (3) et WITTMANN (4). Les travaux de MUNTZ et LAINE (5) sur les pectines ont été complétés par ceux de SEMICHON et FLANZY (6). D'autres études ont contribué à la meilleure connaissance de la distribution des gommes et des pectines dans les raisins, les moûts et les vins (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14).

La pectine se rencontre toujours dans les jus de raisin, mais à des concentrations assez faibles par rapport à beaucoup d'autres fruits. Une étude de M. FLANZY sur les différents cépages de France, entreprise en 1929, a montré que cette dose était non seulement fonction du cépage mais encore du point de maturation du raisin. Pour 60 cépages, elle variait de 0,300 g à 1 g par litre (travaux inédits). Il existe autant de gommes que de pectines dans le jus de raisin et même souvent davantage. En général, la pectine est présente dans les vins à des doses minimes à côté des quantités importantes de gommes (15 *a*, *b*). GAÏVORONSKAYA (16) a constaté pour les vins de la récolte de 1953 que les moûts à teneur élevée en pectine ont donné naissance à des vins ayant moins de moelleux par rapport aux vins issus des moûts pauvres en pectine. D'après TARANTOLA (17), les vins italiens contiennent de 200 à 380 mg par litre de gommes (pentosanes).

Signalons en passant que les enseignements concernant les gommes et les substances pectiques se trouvent dans différents ouvrages et monographies (18).

A côté des pectines et des gommes, le jus de raisin et le vin possèdent d'autres colloïdes (19).

En 1954, BÜCHI et DEUEL (20 *a*) ont signalé la présence dans les jus de raisin d'un polysaccharide acide, responsable d'après BÜCHI (20 *b*),

à côté d'un mannane en provenance des levures, de la formation des gommes dans le vin, à la suite de fermentation alcoolique.

Dans certains vins, surtout provenant de raisins envahis par le Botrutis cinerea, existe le dextrane, substance mucilagineuse, précipitable par l'alcool fort sous forme de filaments. Le terme dextrane constitue la dénomination générale pour les polymères du glucose dont, au moins, 60 p. 100 des liaisons glucosiques sont en α-1,6 (21).

On ne sait pas doser directement le dextrane, colloïde protecteur, dans les vins faits en raison de la faiblesse de ses concentrations (*op. cit.* (19 *c*) p. 436). Le dextrane précipite lorsque le liquide contient environ 20 p. 100 d'alcool, tandis que les gommes exigent 50 à 60 p. 100 (*op. cit.* (19 *b*) p. 148).

Si les renseignements nous manquent en ce qui concerne les jus de raisin, par contre, nous savons que dans les vins les substances colorantes et tanniques se trouvent également, au moins en partie, sous la forme colloïdale.

Les études de Duclaux (22) ont attiré pour la première fois l'attention sur les propriétés colloïdales des colorants des vins.

Les observations de Ribéreau-Gayon et Peynaud (23) sur les précipitations de nature colloïdale dans les vins rouges ont confirmé les vues de Duclaux.

Les essais d'électrophorèse et d'électrodialyse, effectués par Nègre (24) sur une vin rouge, ont démontré l'existence des formes colloïdales des colorants et des tannins solubles dans l'acétate d'éthyle, toutes chargées positivement.

L'importance des colloïdes protecteurs empêchant les troubles ferriphosphatiques a été confirmée dans le cas des vins de Porto par Almeida (25 *a*). Parmi ces substances les protéines, le dextrane, les pectines ont été décelés.

Il est intéressant de noter que les protéines de ces vins appartiennent au groupe des albumines et des globulines ; en outre, la présence des peptones a été également signalée (25 *b*).

Les recherches de Dourmischidzé (26) sur les colorants et les tannins des vins ont permis de constater l'existence d'une relation entre les formes moléculaires et colloïdales des produits de transformation des catéchines et des gallocatéchines.

Également il existe un équilibre entre les fractions moléculaires et colloïdales des colorants et de leurs leucoformes.

Pour le moment nous ne disposons pas d'une méthode permettant de doser séparément les différentes substances colloïdales organiques et minérales présentes dans les jus de raisin, les moûts et les vins.

Toutefois, il est possible depuis les travaux de Doumansky, Charine et Netchaev de doser l'ensemble de ces substances.

D'après NETCHAEV, à qui on doit les analyses des colloïdes hydrophiles des moûts et des vins, les moûts en contiennent 7-10 g par litre, les vins jeunes 5-6 g (27 *a*); les teneurs extrêmes pour les vins, en général, sont comprises entre 9,7 et 3,6. Les vins de dessert (Muscat blanc, Pedro, Tokay) sont riches en colloïdes totaux. Les conditions écologiques influent sur la teneur et les caractères des colloïdes (réversibles et irréversibles) (27 *b*) (*op. cit.* (19 *h*) p. 187).

En utilisant la méthode de dosage de DOUMANSKY (28), NEMTZOVA a trouvé dans un vin de deux ans, destiné à la champagnisation, 3,42 g/l des colloïdes hydrophiles (29). Si on ne possède pas des renseignements exacts sur les caractéristiques qualitatives des colloïdes des vins, par contre, il est possible de conclure, d'après les indices indirects, que la variété qualitative et quantitative de ces colloïdes est très grande (30). D'après NEMTZOVA, l'indice de la capacité mousseuse des vins, reflétant leur teneur en substances tensioactives, oscille entre 1,2 et 61,3. Les vins jeunes sont riches en substances colloïdales, en particulier, en protéides et en produits de leur dégradation. Fait intéressant, les vins rouges produisent la mousse stable en raison de la présence des colorants et des tannins en grande quantité (*op. cit.* (29) p. 109).

Le séjour sur les levures, leurs autolysats favorisent l'augmentation des colloïdes. Le traitement des vins par des préparations enzymatiques permet également d'obtenir l'enrichissement des vins en ces substances, comme l'ont montré GUEORGUIEV, POPOV, TONTCHEV et MANTCHEV (31).

Les opérations technologiques jouent également leur rôle. Le tableau I reproduit les données de NETCHAEV, citées dans l'ouvrage de PROSTOSSERDOV (*op. cit.* (19 h).

TABLEAU I

Influence du passerillage du raisin (Muscat blanc) sur la teneur en colloïdes dans le moût

(*op. cit.* (19 *h*) p. 188, tableau 110).

Opérations technologiques	Pectine g/l.	Substances tanniques et colorantes g/l.	Colloïdes en g/litre			Colloïdes irréversibles en %
			Totaux	Réversibles	Irréversibles	
Contrôle (raisin non passérillé)	0,083	0,411	11,94	10,42	1,52	12,7
Passérillage modéré sur souche	0,002	0,492	12,61	10,92	1,69	13,4
Passérillage fort sur souche.	0,007	0,545	9,49	7,83	1,66	17,5
Passérillage dans un séchoir.	Traces	0,125	8,83	6,475	2,355	26,5

L'étude des colloïdes des jus de raisin date seulement de quelques années. En 1952 MARCH et BONEVA (32) ont publié les résultats de leurs recherches sur la composition des jus obtenus à partir de raisins de cépages différents. La teneur en colloïdes totaux varie de 0,4 p. 100 à 1,12 p. 100 (hybrides). Ces colloïdes contiennent 20-27 p. 100 de cendres, 10-13 p. 100

des protéides et 9-13 p. 100 de substances pectiques. La clarification au moyen de tanisage et de collage diminue la quantité de colloïdes de 25 p. 100 ; la perte en substances azotées est sensible : il en reste presque deux fois moins. Dans les jus non clarifiés, les colloïdes irréversibles constituent 3,66-21 p. 100 de la quantité totale ; les jus clarifiés en contiennent 2,5-12,9 p. 100.

Les jus pasteurisés et rapidement refroidis sont de 3-4 fois moins riches en colloïdes irréversibles par rapport aux mêmes jus refroidis lentement après le chauffage. Nous avons réuni dans le tableau II les résultats indiqués par MARCH et BONEVA pour le jus Seibel 1, en fonction de différentes opérations.

TABLEAU II

Jus de raisin Seibel n° 1 préparé en septembre 1950.

Opération	Colloïdes totaux en p. 100
1° Jus frais, filtré sur papier	1,12
2° Chauffé à 99°C et rapidement refroidi...	0,81
3° *a*) Chauffé à 95°C et refroidi lentement.	0,94
b) Le même conservé 4 mois à + 15 — + 16°C	0,85

Le jus conservé pendant 4 mois contenait 0,85 p. 100 des colloïdes, composés de 0,28 p. 100 de substances pectiques, de 0,078 p. 100 de substances protéidiques, de 0,11 p. 100 de substances minérales (cendres). Le restant comprenait des gommes, des substances tanniques et colorantes, des melanoïdines. Les jus lentement refroidis après la pasteurisation sont plus riches en colloïdes ce qui s'explique par des réactions entre les sucres et les aminoacides. De tels jus étaient plus sombrement colorés et avaient les qualités organoleptiques amoindries.

FAN-UNG (33 *a*) a confirmé que la clarification des jus provoque la destruction des colloïdes instables dont la teneur est de 30 p. 100 de la quantité totale de colloïdes.

Plus tard, cet auteur a étudié l'influence de l'oxygène de l'air et du chauffage sur la destruction des colloïdes des jus de raisin et de pomme (33 *b*).

Le rôle de l'oxydation a été établi en fonction du temps à la température de + 18°C.

Le tableau III reproduit les résultats concernant les jus de raisin plus sensibles à l'oxydation.

Il ressort de l'examen des données du tableau qu'au début du traitement les colloïdes natifs disparaissent ; ensuite d'autres colloïdes apparaissent sans que leur destruction s'arrête. Les colloïdes formés ne sont

TABLEAU III

Influence de l'oxydation

(*op. cit.* (33 *b*) p. 17. Tableau n° 1).

Durée du traitement	Jus de raisin		
	Semi-industriel	Fraîchement préparé	
	Hybrides	Hybrides	Chasselas
	Colloïdes totaux g/litre		
Jus initial	5,42	7,18	9,26
Après 1 heure	2,26	4,32	6,44
— 2 heures	6,02	6,14	8,26
— 3 heures	4,72	5,34	7,42
— 4 heures	3,85	4,56	6,82
— 5 heures	3,45	4,06	6,64
	Colloïdes réversibles g/litre		
Jus initial	2,70	3,12	5,66
Après 1 heure	2,21	2,88	5,28
— 2 heures	3,62	3,06	5,84
— 3 heures	3,40	2,86	5,60
— 4 heures	3,34	2,92	5,36
— 5 heures	3,22	2,68	5,20

pas équivalents aux colloïdes primitifs, ce qui est susceptible de dégrader les qualités des jus ainsi que leur valeur alimentaire.

L'influence de la température pour une durée de 2 mn est également nuisible sur la teneur des colloïdes, surtout si la température atteint ou dépasse + 70°C. Les pertes sont de l'ordre de 50 p. 100.

Le tableau IV résume les résultats obtenus.

TABLEAU IV

Durée du chauffage : 2 minutes

(*op. cit.* (33 *b*) p. 18. Tableau II).

Température du chauffage	Jus de raisin	
	Semi-industriel	Fraîchement préparé
	Hybrides	Chasselas
	Colloïdes totaux g/litre	
Jus initial	4,32	9,54
60°	4,20	9,48
70°	3,58	9,32
80°	2,72	7,66
90°	2,23	6,84
	Colloïdes réversibles g/litre	
Jus initial	3,16	5,28
60°	3,68	5,32
70°	3,36	4,96
80°	2,68	4,14
90°	2,20	3,62

Également les effets de la durée du chauffage à la température constante de + 80°C ont été étudiés. Les résultats sont consignés dans le tableau V.

TABLEAU V

Température du chauffage : + 80°C
(*op. cit.* (33 *b*) p. 18. Tableau III).

Durée du chauffage	Jus de raisin	
	Semi-industriel	Fraichement préparé
	Hybrides	Chasselas
	Colloïdes totaux g/litre	
Jus initial	4,68	10,14
Après 2 minutes	2,94	8,66
— 4 —	3,58	9,22
— 6 —	5,34	10,44
— 8 —	6,02	10,32
— 10 —	5,12	9,86
— 12 —	3,98	9,04
— 14 —	3,62	8,92
— 15 —	3,54	8,76
	Colloïdes réversibles g/litre	
Jus initial	2,96	6,18
Après 2 minutes	2,16	4,88
— 4 —	2,84	5,52
— 6 —	3,54	6,88
— 8 —	3,82	6,96
— 10 —	2,88	5,94
— 12 —	2,34	5,10
— 14 —	2,16	4,94
— 15 —	2,26	4,82

Il est aisé de constater qu'au début du chauffage, la quantité des colloïdes totaux diminue, puis, au bout de 6-8 mn, passe par un maximum souvent supérieur à la teneur initiale, pour diminuer de nouveau. Ces variations montrent qu'au cours du chauffage il se produit la formation et la destruction des colloïdes. En lumière de toutes ces constatations on est amené à conclure que l'élaboration des jus doit s'effectuer à l'abri de l'air et sans chauffage excessif afin de sauvegarder au maximum leurs colloïdes naturels.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES SUR LES COLLOIDES DES JUS DE RAISIN

A. — Leur objet

Les études existantes concernant l'influence du mode de conservation sur la composition chimique des jus de raisin se limitent le plus souvent à mettre en relief les avantages et les inconvénients d'un tel ou

autre procédé sans effectuer la comparaison simultanée des divers procédés de conservation actuellement connus. Or, les problèmes que soulève une telle étude comparative, présentent un intérêt évident tant au point de vue scientifique que pratique.

Nous avons cherché à combler au moins partiellement cette lacune. A cet effet, nous avons étudié l'influence de quatre procédés de conservation — par le froid, à l'acide carbonique, par sulfitation, enfin à l'abri de l'air après pasteurisation — sur quelques composants des jus de raisin obtenus de la même manière, à savoir les colloïdes totaux, les substances volatiles aromatiques, l'activité de la polyphénoloxydase.

D'ailleurs, ces recherches constituent la partie intégrante d'un travail plus vaste non publié (33). Dans ce qui suit nous présenterons quelques données sur les variations des colloïdes totaux.

B. — Méthodes de dosage

Nous avons utilisé pour le dosage des colloïdes totaux, la méthode de Doumansky et Charine pour la betterave, adaptée aux jus de raisin par Charine et Netchaev. Cette méthode a été reproduite dans le mémoire de March et Boneva (*op. cit.* (32)).

a) Mode opératoire.

1. — *Colloïdes totaux.*

A 10 ml de jus, contenus dans une fiole conique de 200 ml, on ajoute 120 ml d'alcool à 96° et 10 ml d'oxyde d'éthyle (éther sulfurique).

On laisse le mélange pendant 30 mn afin d'obtenir une meilleure coagulation des colloïdes, suivant l'indication de Fan-Ung (*op. cit.* (33 *a*)).

Ensuite, on chauffe la fiole, munie d'un réfrigérant ascendant, au bain-marie à 55°-60° pendant 30 mn pour éliminer du précipité les impuretés non colloïdales peu solubles, principalement les tartrates acides.

Sans doute, les phosphates alcalino-terreux, les glycérophosphates sont également insolubles.

Après le refroidissement du liquide on sépare par filtration les colloïdes coagulés en utilisant un filtre sans cendres lavé préalablement par le mélange hydroéthéroalcoolique (eau, éther, alcool en proportion : 1 : 1 : 12) et séché à 100°C pendant 24 heures jusqu'à poids constant en utilisant un pèse-filtre en verre. Le diamètre de filtre n'étant pas précisé, il est préférable, à notre avis, d'éviter les filtres ayant une grande surface. Même les filtres à plaque poreuse seraient plus commodes.

Le lavage du précipité s'effectue plusieurs fois à l'aide du mélange hydroéthéroalcoolique mentionné en employant un volume total de

80 ml (cette quantité est indiquée par FAN-UNG, tandis que MARCH et BONEVA parlent de 10 ml ce qui paraîtrait insuffisant).

Le filtre est séché d'abord à l'air libre, ensuite à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant.

2. — *Colloïdes irréversibles.*

Ce dosage s'effectue d'abord comme précédemment, le lavage au mélange hydroéthéroalcoolique compris.

Ensuite, après avoir laissé sécher le filtre à l'air libre, on traite le précipité avec de l'eau distillée portée à 45°-50°C. On sèche ensuite à l'étuve à 100°C.

3. — *Colloïdes réversibles.*

La teneur en colloïdes réversibles est calculée par différence.

b) Expression des résultats.

Pour chaque jus on exécute 3-4 essais parallèles, ce qui nécessite en tout 5-6 essais au minimum.

Les résultats sont exprimés en pourcentages ou en grammes par litre.

C. — Caractéristiques des jus utilisés

Deux sortes de jus ont été expérimentés.

D'une part, les jus préparés à la Station à partir des Raisins frais. Tous ces jus constituent la série « Jus I ».

D'autre part, les jus préparés à la Station à partir de deux jus de base conservés industriellement en frigorifique. Ces jus sont à l'origine de la série « Jus II ».

Les caractéristiques analytiques des jus avant le début des essais sont consignées dans le tableau VI.

TABLEAU VI

Caractéristiques analytiques des jus de raisin.

Nature du jus	pH	Acidité totale gr H_2So_4 par litre	Sucres g/litre	Vit. C mg/litre	Vit. Bl gammas par litre	Substances tanniques et color. en gallotanin g/litre	Substances azotées N mg/litre
Jus I :							
Rouge (Carignan + Morastel) ..	3	8	147,1	50	120	0,5421	203
Blanc (Chasselas).	2,35	4,1	183,1	45	166	0,2502	378
Jus II :							
Rouge (Aramon + Carignan + Morastel)	3,35	3,6	153	45	0,8	1,086	385
lBanc (Seyve-Villard 12375)....	3,5	3,3	159	23,7	1,7	0,5481	8

Pour la série « Jus I » on a utilisé, d'une part, le raisin blanc de Chasselas et, d'autre part, les raisins rouges de Carignan et de Morastel. Ces derniers sont mélangés en proportion de 50 p. 100 chacun pour obtenir un jus coloré.

Chacun de ces jus a été réparti en deux lots. Un lot a été placé en frigorifique pendant 8 jours. Après ce temps on a séparé la partie liquide du dépôt. Et le liquide a été partagé en trois parts, chaque part subissant un mode de conservation différent. Les voici :

— Jus conservé sous pression de 5 kg de gaz carbonique à une température inférieure à + 10°C.

— Jus mis en bouteilles de 125 ml capsulées déposées au frigorifique à 0°C.

— Jus en bouteilles de 125 ml capsulées, pasteurisées dans un bain-marie à 80°C pendant 25 minutes.

On avait alors les quatre types suivants :

1° Jus sulfité désulfité.

2° Jus conservé par le froid.

3° Jus pasteurisé.

4° Jus conservé sous pression de gaz carbonique.

Les jus d'origine industrielle avaient été stockés en frigorifique à — 2°-0°C pendant 1 mois. Juste avant leur mise en frigorifique ils avaient subi une filtration stérilisante à l'aide d'un filtre à plaques. On a expérimenté deux jus, un Jus Rouge mélange de Jus d'Aramon 40 p. 100, de Carignan et de Morastel 20 p. 100 et un jus blanc de l'Hybride Seyve-Villard 12 375.

Pour chacun de ces jus on a fait les trois lots suivants :

— Jus sulfité à raison de 1 g/l d'anhydride sulfureux et désulfité 8 jours après avec mise en bouteilles de 125 cc.

— Jus conservé sous pression de gaz carbonique à une température voisine de + 8°C.

— Jus pasteurisé en bouteilles de 125 cc au bain-marie à 80°C pendant 25 minutes.

Nous devons signaler que la désulfitation dans les deux séries n'a pas été faite avec la même technique.

Pour la série I on a utilisé un appareil de laboratoire en verre qui n'est autre qu'un appareil avec réfrigérant à reflux. (35). Après ébullition d'une durée de 10 minutes sous une pression de 59 cm de mercure, à la température de 94°5, le jus chaud est mis en bouteilles *au contact de l'air*.

Il y a lieu de remarquer que le mode d'embouteillage utilisé présente l'inconvénient des manipulations avec le jus chaud à l'air libre et, par conséquent, en présence de l'oxygène de l'air. Des modifications indésirables sont à craindre dans ces conditions. En outre, le refroidissement

des jus s'opère très lentement, ce qui, comme nous l'avons vu, produit un effet défavorable sur l'évolution des colloïdes des jus.

Pour la série II on a utilisé un appareil prototype à fonctionnement continu en acier inoxydable représentant l'appareil désulfiteur mis au point à la Station (36). L'embouteillage à chaud est effectué *à l'abri de l'air*.

Principe et modalités des deux désulfitations sont bien différents. Elles se traduisent par des caractéristiques organoleptiques bien distinctes avec une nette supériorité pour le système appliqué à la Série II.

Ceci ne devra pas être perdu de vue chaque fois qu'un jugement sera porté sur les jus « désulfités ».

D. — Résultats obtenus. Leur discussion

Pour des raisons d'ordre matériel nos essais sur les variations des colloïdes totaux des jus de raisin en fonction du mode et de la durée de conservation n'ont pas pris l'ampleur souhaitée par nous.

Les expériences de courte durée (1 mois) ont porté sur les jus conservés par le froid, par le gaz carbonique, à l'abri de l'air après la pasteurisation et après une sulfitation peu prolongée (8 jours).

Les résultats de dosage des colloïdes sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Jus préparés le 7 septembre 1956 *et analyses un mois après (Jus I)*
Teneur en colloïdes en grammes/litre.

Mode de conservation	Jus rouge (Carignan + Morastel)			Jus blanc (Chasselas)		
	Totaux	Irréversibles	Réversibles	Totaux	Irréversibles	Réversibles
Jus frais	14,62	8,86	5,76	13,08	8,69	4,39
Froid (à 0°C)	12,85			12,83		
Gaz carbonique	13,12			13,06		
A l'abri de l'air après pasteurisation	11,54			12,96		
A l'abri de l'air après la sulfitation de 8 jours et la désulfitation	12,88			9,34		

Il ressort de l'examen des résultats que :

1° Les jus expérimentés contiennent une quantité élevée des colloïdes irréversibles, de l'ordre de 65 p. 100 de la teneur en colloïdes totaux.

2° Les substances colloïdales diminuent en fonction du temps.

3° Ces modifications sont en relation avec les modes de conservation.

Les pertes sont moindres dans les jus conservés par le procédé au gaz carbonique. La pasteurisation a une influence plus marquée. D'ail-

leurs, le mode opératoire utilisé est nettement défavorable pour la stabilité des colloïdes. La flash-pasteurisation produirait à priori des modifications moindres (*op. cit.* (33 *b*) p. 18). D'après MARCH et BONEVA (*op. cit.* (32)) le chauffage, suivi d'un refroidissement rapide, détermine l'appauvrissement moins prononcé en colloïdes.

Les résultats du tableau VIII montrent que la diminution des colloïdes totaux s'accentue avec la durée de conservation ce qui confirme les constatations du tableau précédent.

TABLEAU VIII

Jus rouge industriel (*Jus II*).

Mode de conservation	Date d'analyse	Colloïdes en g/l.		
		Totaux	Irréversibles	Réversibles
Au départ	1.2.56	11,04		
Gaz carbonique	1.5.56	8,40		
A l'abri de l'air après la sulfitation de 8 j. et la désulfitation	1.6.56	7,30	5,50	1,80

IV. — CONCLUSION

Les travaux existants, peu nombreux d'ailleurs, sur les colloïdes totaux, réversibles et irréversibles, dans les jus de raisin n'ont pas encore abordé le problème de l'influence des différents modes de leur conservation sur la stabilité de ces colloïdes.

Afin de compléter, au moins partiellement, la lacune signalée, nous avons effectué un certain nombre d'essais comparatifs. Des difficultés d'ordre matériel nous ont empêché d'élargir le domaine de notre expérimentation.

Néanmoins, quelques résultats obtenus pour la première fois en France sont suffisamment significatifs et donnent une première idée sur les modifications des colloïdes des jus de raisin conservés dans différentes conditions.

Tout en considérant nos expériences comme les essais d'orientation, nous pensons que les observations enregistrées constituent, malgré leur caractère quelque peu fragmentaire, une contribution à une meilleure connaissance du comportement des jus au cours de leur conservation.

De telles recherches comparatives mériteraient d'être reprises et poursuivies à une plus grande échelle en raison de leur importance pour la technologie rationnelle d'élaboration des jus de fruits.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) PASTEUR (L.). — Études sur le vin, 1873, 2e éd. 293.

(2) NIVIÈRE (G.), HÉBERT (A.). — Sur la gomme des vins, *C. R. Ac. Sci. Fr.* **121**, 360, 1895, *Moniteur Scient.*, **39**, 770, 1895.

(3) COMBONI (E.). — Presenza e determinazione dei pentosani nell'uva et nei suoi derivati. *Le Stazioni Sper. Agr. It.*, **29**, 815, 1896.

(4) WITTMANN (C.). — *Z. für landwirtsch. Versuchswesen. in Osterreich*, **4**, 137, 1901. (D'après von der HEIDE (C.), SCHMITTHENNER (F.) Der Wein, 65, 1922. Braunschweig Vieweg Verlag).

(5) *a*) MÜNTZ (A.). — Le moelleux des vins. *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **140**, 346, 1905 ; *Revue Vit.*, **23**, 187, 1905.

b) MÜNTZ (A.), LAINÉ (E.). — Les matières pectiques dans le raisin et leur rôle dans la qualité des vins. *Ann. Brass. Dist.*, **9**, 157, 173, 1906.

(6) *a*) SÉMICHON (L.), FLANZY (M.). — Sur les pectines des raisins et le moelleux des vins, *C. R. Ac. Sci. Fr.*, **183**, 394, 1926. Sur la constitution et le dosage des pectines et des gommes dans le vin et le moût de raisin. *Ann. Fals. Fraudes*, **20**, 395, 1927.

b) SÉMICHON (L.). — Les pectines du raisin et le moelleux des vins. *Ch. et Ind.*, **17**, 25, 1927.

(7) MARSH (G.), PITMAN (G.). — *Fruit Products J.*, **9**, 187, 1930 (d'après le renvoi (2 c) p. 302).

(8) HOPKINS (E.), GOURLEY (J.). — *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 164, 1930 (d'après le renvoi (2 c) p. 303).

(9) MEHLITZ (A.). — *Allgem. Deut. Konserven Ztg.*, **20**, 113, 1933 (d'après le renvoi (2 c) p. 303).

(10) BARBERA (G.) *a*) Richerche sperimentale sulla pectina dell'uva. *Ann. tech. agrar.*, **6**, 229, 1933. — *b*) Sulla sostanze estrattiva dei vini. I Pectine e gomme. *Ann. Chim. applic.*, **23**, 95, 1933.

(11) SADJADI (A.). — Recherches sur les matières pectiques dans un vin. Thèse Sciences, 1936, Bordeaux.

(12) FELLENBERG (Th.). — Beitrag zur Untersuchung von Mistellen und Süs-Weinen. *Mitt. Gebiete Lebensm. u. Hyg.*, **35**, 77, 1944.

(13) FRANCOT (P.), GEOFFROY (P.). — Les pectines et les gommes dans les moûts et les vins de Champagne, IV Congrès Inst. Vigne et Vin, 1950, Athènes, *Bull. Office Int. Vin*, **24**, n° 242, 94, 1951.

(14) SOLMS (J.), BÜCHI (W.), DEUEL (H.). — Untersuchungen über den Pektingehalt einiger Traubenmoste. *Mitt. Gebieté Lebensm. u. Hyg.*, **43**, 303, 1952.

(15) *a*) PEYNAUD (E.). — Sur les matières pectiques des moûts de raisin et des vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **45**, 11, 1952. — Sur les matières pectiques des fruits. *Ind. Agr. Alim.*, **68**, n° 11-12, 609, 1951.

b) GEORGEAKOPOULOS (G.), LYDAKE (Mme N.). — La présence de matières pectiques dans les moûts et les vins grecs (Titre traduit). *Trav. réc. Inst. Vin*, Grèce, 49, 1957.

(16) GAÏVORONSKAYA (Z.). — Sur les pectines du moût de raisin (Trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Œnologie et Viticulture), S. S. S. R., n° 8, 12, 1955.

(17) TARANTOLA (C.). — Pentosi e pentosani nei vini e bilancio dei carboidrati fermentescibili e infementenscibili. *Riv. Vit. Enog.*, **3**, 287, 315, 1950.

(18) *a*) BARY (P.). — Colloïdes organiques, dans GRIGNARD (V.). *Traité de Chimie org.*, **1**, 340, 1935, Paris, Masson éd.

b) BEAUQUESNE (Mlle L.). — Les substances polyuroniques (gomme, mucilages, pectines, pseudocelluloses). *Ann. Pharm.*, **4**, 271, 1946 ; **11**, 296, 1953 ; **12**, 795, 1957.

c) Dorée (Ch.). — Les méthodes de la chimie de la cellulose, 1949, Paris, Dunod, éd.

d) Deuel (H.), Solms (J.), Altermatt (H.). — Die Pektinstoffe und ihre Eigenschaften, Vierteljahrschrift der Naturforsch. Gesellschaft, Zurich, Suisse, **98**, 49, 1953.

e) Kertesz (Z.). — The pectic substances, 1951, New-York-London, Interscience Publishers.

f) Joslyn (M.). — Methods in food analysis applied to plant products, 141, 453, 462, 1950, New-York, Acad. Press.

(19) *a*) Seifert (W.). — Sur les colloïdes en général et en particulier, sur ceux du moût et du vin. *Das Weinland*, **8**, 50, 1936 (d'après le renvoi (19-*b*) p. 143). — *Die Chemie des Mostes und Weines*, 45, 1938, Mainz-Wiesbaden.

b) Ribéreau-Gayon (J.). — Traité d'Œnologie, 125, 145, 1947. Paris-Liège, Béranger, éd.

c) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins, 434, 1947. Paris-Liège, Béranger éd.

d) Frolov-Bagreev (A.), Agabaliantz (G.). — Chimie du vin (Trad.), 17, 39, 180, 1951, Moscou, Pischepromizdat, éd.

e) Jaulmes (P.). — Analyse des vins, 191, 1951, Montpellier, Poulain, éd.

f) Vogt (E.). — Weinchemie und Weinanalyse, 61, 1953, Stuttgart, Ulmer Verlag.

g) Garoglio (P.). — Nuovo trattato di Enologia, **2**, 943 ; **3**, 586, 1953, Sansoni Edizione Scientifiche.

h) Prostosserdov (N.). — Bases d'Œnologie, 39, 177, 186, 1955, Moscou, Pischpromizdat, éd.

i) Amerine (M.). — Composition of wines I Organic constituants Advances in Food Res., **5**, 426, 1954, New-York, Acad. Press.

(20) *a*) Büchi (W.), Deuel (H.). — Ueber ein Polysacharid im Beerensaft von Vitis Vinifera L. *Helv. Chim. Acta*, **37**, 1392, 1954.

b) Büchi (W.). — Thèse, Tech. Hochschule, Zürich, 1954.

(21) *a*) Allene (J.). Dextran. A selected Bibliography 1952, Peoria (Ill.), U. S. A., Northern Reg. Res. Labo, éd.

b) Bixler (G.), Hines (G.), Mac Ghee (F.), Shutter (R.). — Le dextrane. *Ch. et Ind.*, **71**, nº 3, 489, 1954, *Ind. Eng. Chem.*, **45**, 692, 1953.

c) Frank (H.), Mark (H.). — Zur Struktur der Dextrane *Monatsch. Chem. Oesterr*, **85**, nº 2, 307, 1954.

(22) Duclaux (E.). — Sur la matière colorante du vin. *Ann. Chim. et Phys.*, **3**, (5), 108, 1874. — Sur le vieillissement des vins, *Ann. Inst. Pasteur*, **7**, 537, 1893. — Matière colorante, *Traité de Microbiologie*, **4**, 564, 1909, Paris, Masson, éd.

(23) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.). — Formations et précipitations de colloïdes dans les vins rouges. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **71**, 720, 1935.

(24) Nègre (E.). — Contribution à l'étude des matières tannoïdes du vin. Thèse Sc. Montpellier, 1945.

(25) Almeida (de H.). — *a*) Contribuçao par estudo dos fenomenos de oxidaçao-reduçao no vinho do Porto. *Anais Inst. Vinho* Porto, 1952. *b*) Estudo polarografico de algunas proteinas puras. *Ibidem* 1948.

(26) Dourmischidzé (S.). — Substances tanniques et anthocyannes de la vigne et du vin (Trad.), 264, 269, 272, 279, 1955, Moscou, *Ac. Sci. S. S. S. R.* éd.

(27) Netchaev (L.). — *a*) Koll. Journal (*Revue colloïdale*), S. S. S. R., **5**, 27, 1939 (d'après le renvoi (29)). — *b*) Troubles du vin (Trad.) 1951, Moscou, Pischepromizdat, éd.

(28) Doumanskii (A.). — Importance des colloïdes hydrosolubles dans la technologie de l'industrie alimentaire et leur dosage (Titre trad.). Moscou-Leninegrad, 1941, Pischepromizdat, éd.

(29) NEMTZOVA (Z.). — Sur les propriétés mousseuses des vins de Champagne (Titre trad.). *Troudy Krasnodarskago Instituta Pischevoï Promischlennosti* (Trav. Inst. Ind. Alim. Krasnodar), S. S. S. R. nº 3, 83, 1948.

(30) AGABALIANTZ (G.). — Contrôle chimico-technologique de la production du Champagne soviétique (Titre trad.), 30, 1954, Moscou, Pischepromizdat, éd.

(31) GUEORGUIEV (I.), POPOV (I.), TONTCHEV (T.), MANTCHEV (S.). — De l'effet d'un produit enzymatique de Botrytis Cinerea sur l'accélération de la maturation du vin. *Le Progrès Agric. Vit.*, **146**, 211, 1956.

(32) MARCH (A.), BONEVA (L.). — Recherches sur les colloïdes du jus de raisin (Titre traduit), *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Œnologie et Viticulture), S. S. S. R., nº 9, 14, 1952.

(33) FAN-UNG (A.). — *a*) Système colloïdal des jus de fruits (Titre trad.), *Vinodélié i Vinogradarstvo, S. S. S. R.*, nº 6, 13, 1953. — *b*) Modification des colloïdes au cours de l'élaboration du jus de raisin et de pomme (Titre trad.), *Vinodélié i Vinogradarstvo, S. S. S. R.* nº 1, 17, 1957.

(34) RIFAÏ (H.). — Influence du mode de conservation du jus de raisin sur sa composition et ses qualités. Thèse Univ. Toulouse 1956, manuscrit dactylographié.

(35) FLANZY (M.). — *a*) La désulfitation des vins et des jus de fruits. — *Ind. Agr. Alim.*, **66**, 31, 1949. — *b*) Nouvelles bases de l'industrie du jus de raisin. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **33**, 139, 1947.

(36) FLANZY (M.), ANDRÉ (P.). — L'évolution des techniques de désulfitation et l'élaboration des jus aromatisés. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **41**, 738, 1955.

VARIATIONS DE L'INDICE DES SUBSTANCES VOLATILES DES JUS DE RAISIN AU COURS DE LEUR CONSERVATION

PAR

L. DEIBNER et H. RIFAI [1]
Station centrale de Technologie
des Produits Végétaux,
Narbonne (Aude).

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Aperçu des travaux concernant l'identification et le dosage des substances volatiles du raisin.

III. — Recherches personnelles.

A. — Description de la méthode d'évaluation de l'indice des substances volatiles.

B. — Résultats obtenus, leur discussion.

IV. — Conclusion.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Les principes odorants des végétaux, huiles essentielles, ne sont pas, dans la grande majorité des cas, des individus chimiques, mais bien des mélanges souvent complexes de composés très variés appartenant aux séries grasse, aromatique et cyclique, comme les carbures, alcools, esters, aldéhydes, cétones, phénols, acides, etc.

Il est du plus haut intérêt, aussi bien au point de vue purement scientifique qu'au point de vue pratique, de connaître la nature et les propriétés des substances qui composent les huiles essentielles ainsi que les méthodes d'identification, de dosage, d'extraction de ces corps dans les raisins et les jus.

L'aperçu des travaux correspondants sera exposé dans le chapitre suivant.

II. — APERÇU DES TRAVAUX CONCERNANT L'IDENTIFICATION ET LE DOSAGE DES SUBSTANCES VOLATILES DU RAISIN

Malgré tout l'intérêt témoigné dans le passé aux substances aromatiques du raisin, il n'existe que peu de travaux consacrés à ce sujet.

Les premières recherches, dues à POWER (1) et à POWER et CHESTNUT (2) concernaient les raisins de Vitis Labrusca et d'autres espèces d'origine américaine. Le principe odorant de ces raisins a été identifié comme étant un méthylanthranilate. Toutefois, cette substance n'a pas une présence universelle et de ce fait ne constitue pas un corps spécifique pour les raisins de Vitis Labrusca. D'autres travaux ont complété ces premiers renseignements (3) (4) (5). Il y a quelques années, HOLLEY, STOYLA et HOLLEY (6) ont étudié la composition d'une huile essentielle obtenue à partir de jus de raisin Concord : approximativement 88 p. 100 des substances volatiles des jus de ce raisin sont constituées par l'alcool éthylique ; le méthanol intervient pour 4 p. 100, les acétates d'éthyle et de méthyle pour 9 p. 100. En ce qui concerne le méthylanthranilate, sa quantité est à peine de 0,1 p. 100.

Il y a peu de données concernant les substances aromatiques des raisins de Vitis Vinifera, sans doute, en raison de la faiblesse de leurs concentrations. SALE et WILSON (*op. cit.* (4)) ont signalé la présence d'un acide et d'un ester non identifiés.

D'après HAAGEN-SMITH, HOROSAWA et WANG (7), l'huile essentielle du raisin Zinfandel (Frankenthal) ne contient pas d'esters de l'acide anthranilique ; l'alcool éthylique, le phtalate de *n*-butyle et l'acétaldéhyde paraissent être ses principaux constituants.

NJLOV a isolé du raisin Muscat Blanc une huile essentielle de densité 0,820 à 20°C et d'indice de réfraction $n_{20}^{D} = 1{,}4603$. Son rendement est de 0,624 p. 100 du poids des grains(8).

D'après les indications plus anciennes citées également par PROSTOSSERDOV (9), le rendement serait de 0,007 p. 100 par rapport aux grains frais, ou 0,024 p. 100 par rapport au poids sec. Les caractéristiques de cette huile sont les suivantes : densité à 20°C : 0,8920 ; indice de réfraction $n_{20}^{D} = 1{,}4003$.

Tout récemment BAYER (9) a décelé dans les jus de raisins blancs les esters des acides formique, acétique, des acides en $C_{.6}$-$C_{.10}$ et en petite quantité ceux des acides propionique, butyrique, valérianique et aussi des acides aromatiques ; la présence à l'état libre de l'éthanal, de l'hexanal et des traces d'aldéhydes supérieurs a été également constatée.

On trouvera des renseignements plus complets concernant les substances aromatiques du raisin dans quelques ouvrages œnologiques (10).

En ce qui concerne le dosage global de ces substances, l'emploi des

procédés directs, d'après le poids ou le volume, n'est pas commode en raison de leurs faibles quantités. Les procédés indirects, basés sur l'oxydation du distillat par un mélange oxydant, conviennent mieux.

En 1953, KOCH et BREKER (11) ont appliqué aux jus de pomme et de raisin la méthode de DIEMAIR et LOTZBEYER (12), dérivée de celle de WIDMARK pour le dosage de l'alcool dans le sang, et adaptée pour évaluer les substances volatiles aromatiques des légumes secs.

Le principe de cette détermination est le suivant : 2 ml de jus sont placés dans une petite capsule suspendue à l'intérieur d'une fiole de dimensions déterminées et bouchée émeri. Le mélange sulfochromique garnit le fond de cette fiole. Un essai à blanc s'exécute dans les mêmes conditions, en présence de 2 ml d'eau. Les deux fioles sont chauffées pendant une heure à l'étuve portée à + 70°C. Après le titrage iodométrique, on obtient l'indice d'arôme (Aromazahl) exprimé en ml de la solution d'hyposulfite de sodium 0,02 N pour une prise d'essai de 2 ml. Les valeurs de cet indice dépendent de la nature des substances volatiles. L'apparition d'alcool éthylique dans les jus se traduit par l'augmentation de l'indice, ce qui permet de déceler le début de fermentation. L'acide sulfureux n'influe pas sur le dosage.

L'indice varie dans les jus conservés en fonction de la durée et du mode de conservation et de traitement.

Également en 1953, NILOV (13-*a*) a publié la description de son procédé plus simple d'évaluation des substances volatiles (1) Il est basé sur l'oxydation par un mélange sulfochromique du distillat obtenu à partir du jus dilué. Les résultats sont exprimés en ml d'hyposulfite de sodium 0,2 N. Cette détermination permet de caractériser les cépages, ce qui présente un intérêt pratique.

A l'aide de cette méthode NILOV et MALTABAR (13-*b*) ont suivi la variation des substances aromatiques au cours de la maturation des raisins d'un certain nombre de cépages au point de vue de leur sélection pour l'élaboration des eaux-de-vie du type Cognac ; les auteurs ont montré toute l'utilité de la connaissance des teneurs de ces substances pour déterminer la date propice de la vendange.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES

Comme nous l'avons vu, il existe très peu de travaux consacrés au dosage des substances volatiles aromatiques dans les jus de raisin.

Guidés par l'intérêt pratique de telles investigations, nous avons suivi les variations de l'indice caractérisant globalement ces substances dans

(1) M. le Professeur N. SISSAKIAN, Membre-correspondant de l'Académie des Sciences de S. S. S. R., a bien voulu m'adresser un tiré-à-part de la publication de V. NILOV introuvable en France. Qu'il veuille bien accepter l'expression renouvelée de ma reconnaissance pour son amabilité! (L. Deibner).

quelques jus de raisin conservés suivant différentes techniques. Leurs modalités ont été exposées dans notre précédent mémoire consacré aux colloïdes totaux (14).

A. — Évaluation de l'indice des substances volatiles.

Pour effectuer l'évaluation des substances volatiles totales des jus de raisin, nous avons fait appel à la méthode de NILOV en raison de la simplicité de l'appareil distillatoire et de la commodité du mode opératoire.

La prise d'essai indiquée par l'auteur est de 20 g de raisins ou de marcs ou de jus. Dans notre technique, elle variait de 5 à 20 ml suivant la nature ou l'état des jus.

L'appareil distillatoire se compose d'un ballon à fond rond de 250 ml de capacité avec rodage et d'un réfrigérant incliné à 45° comportant un rodage et à l'autre extrémité un tube coudé muni d'un bouchon avec un tube de communication avec l'atmosphère. Le distillat est reçu dans un récipient de 60-70 ml contenant 5 ml de mélange sulfochromique normal (50 g de bichromate de potassium, 500 ml d'acide sulfurique concentré pur, le tout amené à un litre avec de l'eau distillée).

On introduit dans le ballon une prise d'essai, 150 ml d'eau distillée et quelques grains de pierre ponce.

Après avoir distillé le volume de 50 ml, on verse le liquide obtenu dans un bécher de 100 ml, on rince le ballon avec de l'eau distillée, on couvre le bécher avec un verre de montre et on chauffe au bain-marie bouillant pendant une heure pour parfaire l'oxydation des substances volatiles. Le liquide refroidi est transvasé dans un erlenmeyer d'un litre de capacité ; on y ajoute 25 ml d'une solution d'iodure de potassium à 10 p. 100. La fiole bouchée est laissée au repos pendant 3 minutes. Ensuite on additionne d'eau distillée pour avoir un volume de 300-350 ml et on titre au moyen d'hyposulfite de sodium 0,2 N en présence d'un ml d'empois d'amidon à 1 p. 100 ajouté à la fin du titrage.

L'essai à blanc exécuté dans les mêmes conditions avec le volume d'eau correspondant à celui de la prise d'essai de jus permet de connaître la quantité de bichromate consommé. La teneur en substances volatiles s'exprime donc en ml d'hyposulfite 0,2 N. La quantité de cette solution pour 100 ml de jus constitue ce que nous avons appelé l'indice des substances volatiles du jus.

Tous nos essais ont été faits en double.

B. — Résultats obtenus, leur discussion.

Le dosage des substances volatiles a été effectué dans les mêmes jus de raisin décrits dans notre publication précédente (*op. cit.* (14)), c'est-à-dire dans les jus préparés à la Station à partir des raisins frais (Jus I) et

à partir de deux jus de base conservés industriellement en frigorifique (Jus II).

Les résultats obtenus avec les jus préparés à la Station et conservés pendant un mois dans différentes conditions sont consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

Jus préparés le 7 septembre 1956 et analysés un mois après (Jus I). Indice des substances volatiles en ml d'hyposulfite 0,2 N pour 100 ml de jus.

Mode de conservation	Jus Rouge (Carignan-Morastel)	Jus Blanc (Chasselas)
Jus frais	13,0	12,2
Froid	12,8	12,0
Gaz carbonique	13,2	12,0
A l'abri de l'air après la pasteurisation	12,5	7,5
A l'abri de l'air après la sulfitation de 8 j. et la désulfitation	9	4
Sulfitation pendant un mois	9	—

Aucune modification notable pour les jus conservés au frigorifique et sous pression de gaz carbonique. Le jus blanc a perdu une certaine quantité de substances volatiles au cours de la pasteurisation.

Quant aux pertes dans le cas des jus sulfités, elles sont imputables, comme nous l'avons signalé dans notre précédente publication, aux imperfections matérielles au cours de l'embouteillage des jus désulfités à chaud en présence de l'air. Dans ces conditions, l'évaporation et l'oxydation des substances volatiles sont inévitables, et d'autant plus grandes que la durée des opérations est plus longue.

Il serait possible de supprimer de telles pertes par des aménagements permettant de travailler à l'abri de l'air comme on le fait avec l'appareil prototype à fonctionnement continu Flanzy-André.

L'absence d'alcool éthylique dans les jus expérimentés a été constatée au moyen de la méthode chimique (16).

L'éthanal se trouvait en petite quantité. Son dosage a été effectué à l'aide de la méthode iodométrique (17), combinée avec la distillation sous vide partiel (18). D'ailleurs, le mode opératoire correspondait à celui utilisé dans le cas des Vins Doux Naturels (19) et comprenait l'emploi de l'appareil distillatoire pour le dosage de l'anhydride sulfureux total (20).

Les résultats de ces dosages sont donnés dans le tableau II.

Les teneurs en alcool méthylique déterminées par la méthode électrophotométrique à l'acide chromotropique (21) ont été les suivantes : pour le jus rouge de 10 à 26 mg par litre suivant le mode de conservation, pour le jus blanc de 4 à 12 mg.

La quantité d'anhydride sulfureux total dosé iodométriquement (*op. cit.* (20)) était d'une façon générale dans tous les jus désulfités de l'ordre de 10 mg par litre.

TABLEAU II

Jus préparés le 7 septembre 1956 *et analysés un mois après* (*Jus I*). *Ethanol en* p. 100, *Ethanal en mg par litre.*

Mode de conservation	Jus Rouge		Jus Blanc	
	Ethanol	Ethanal	Ethanol	Ethanal
Froid	néant	1,7	Néant	0,88
Gaz carbonique	«	—	«	«
A l'abri de l'air après la pasteurisation	«	0,88	«	«
A l'abri de l'air après la sulfitation de 8 j. et la désulfitation	«		«	«
Sulfitation	0,05	4,4	«	«

En ce qui concerne les variations des substances volatiles dans les jus de la série II (Jus II), les résultats de leur dosage, réunis dans le tableau III, montrent que les jus, rouge et blanc, conservés sous pression de gaz carbonique, ont subi un commencement de fermentation, ce qui n'est pas le cas des jus conservés à l'abri de l'air après la pasteurisation. Ces jus, rouge et blanc, accusent des pertes sensibles en substances volatiles au bout de 4 mois de conservation après la pasteurisation.

TABLEAU III

Jus de la série II (*Jus II*). — *Début des essais : le* 1er *février* 1956. *Indice des substances volatiles en ml d'hyposulfite* 0,2 *N pour* 100 *ml de jus.*

Mode de conservation	Jus Rouge (Aramon + Carignan + Morastel)			Jus Blanc (Hybride 12 375)		
	1-2-1956	1-5-56	1-6-56	1-2-56	1-5-56	1-6-56
Jus initial	14,2			12,8		
Gaz carbonique	—	18,6	18,4		17,8	17,4
A l'abri de l'air après pasteurisation			7,2			6,5

Nous n'avons pas cru utile de mettre en comparaison les résultats de dosage pour les deux catégories de jus sulfités :

— restés sulfités pendant 8 jours, ensuite désulfités et conservés à l'abri de l'air,

— ayant subi la sulfitation peu prolongée, 3 ou 4 mois, et désulfités avant l'analyse.

En effet, la désulfitation de ces jus a été réalisée avec l'appareil semi-industriel FLANZY-ANDRÉ (22). Dans cet appareil continu, d'un débit horaire de 30-50 l, le jus, coulant en couche mince de l'ordre de quelques millimètres, est porté à l'ébullition pendant 3 mn environ, sous pression de 46 cm (température de 87°C). La contenance de l'appareil en marche normale étant de 5 l, il est nécessaire de disposer d'une dizaine de litres de

jus au moins pour que le fonctionnement de la colonne soit normalisé. Or, au cours de notre expérimentation, le volume de jus à désulfiter ne dépassait pas 5 l. Dans ces conditions, l'allure de désulfitation était très lente avec nécessité de recyclage. Cette circonstance a été préjudiciable aux substances volatiles des jus traités ; les pertes étant, au bout de 4 mois de conservation, de l'ordre de 70 p. 100 au moins.

Ne disposant pas des données correspondantes au régime normal du désulfiteur, nous ne pouvons aucunement admettre comme significatifs les résultats obtenus. En effet, ces derniers caractérisent tout au plus la défectuosité d'une technique laissant une marge trop faible entre la mise en route et le fonctionnement normal de l'appareil. Cette circonstance ne permet pas de garantir l'intégrité et l'homogénéité des jus embouteillés au point de vue de ce qui nous intéresse.

Le tableau IV contient les données analytiques concernant l'éthanol et l'éthanal. L'augmentation des teneurs de ces substances dans les jus conservés sous pression de gaz carbonique confirment la constatation fournie déjà par l'indice des substances volatiles.

TABLEAU IV

Jus de la série II (Jus II). — Début des essais : le 1er février 1956. Ethanol en p. 100, *Ethanal en mg par litre.*

Mode de conservation	Jus Rouge				Jus Blanc			
	Ethanol		Ethanal		Ethanol		Ethanal	
	1-5	1-6	1-5	1-6	1-5	1-6	1-5	1-6
Gaz carbonique	0,36	0,65	15,84	17,60	0,36	0,39	17,6	19,36
A l'abri de l'air après la pasteurisation	—	—	—	1,7	—	—	—	1,7
A l'abri de l'air après la sulfitation de 8 jours et la désulfitation	0,01	0,18	7,04	7,04	—	0,18	5,48	5,48
Sulfitation	0,74	0,83	—	—	1,3	1,5	—	—

Les jus sulfités sont également caractérisés par la présence d'alcool et d'aldéhyde, due à l'activité de levures actives paraissant, d'après l'examen microscopique, bien accommodées à des doses assez élevées d'anhydride sulfureux.

En ce qui concerne l'alcool méthylique, sa teneur dans les jus rouges est de 4 à 43 mg par litre et dans les jus blancs de 4 à 13 mg.

Pour des raisons d'ordre matériel, il ne nous a pas été possible d'effectuer la comparaison des deux méthodes de dosage des substances aromatiques établies, d'une part, par KOCH et BREKER et, d'autre part, par NILOV. Il serait même intéressant d'étudier les effets sur l'indice de la distillation sous vide partiel avec la mise au point de l'appareil permettant la distillation à la pression ordinaire et sous vide partiel.

Malgré le caractère incomplet de notre expérimentation, les résultats obtenus démontrent l'utilité pratique des dosages des substances volatiles aromatiques dans les jus de raisin,et militent en faveur d'autres recherches plus développées.

IV. — CONCLUSION

La détermination de l'indice des substances volatiles dans les jus de fruits et, en particulier dans les jus de raisin, présente un intérêt pratique évident. La connaissance de ses variations au cours de l'élaboration et de la conservation de ces boissons permet de déceler les changements dans leur composition chimique, dus à l'activité des levures et des bactéries, et aussi soit les imperfections, soit la mauvaise conduite des opérations technologiques.

Reçu pour publication le 28 novembre 1957.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Power (F.). — The detection of methyl-anthranilate in fruit juice. *Amer. Chem. Soc. J.*, **43**, 377, 1921.

(2) Power (F.), Chestnut (V.). — *a*) The occurrence of methylanthranilate in grape juice. *Amer. Chem. Soc. J.*, **43**, 1741, 1921. — *b*) Examination of authentic grape juices for methyl-anthranilate. *J. Agr. Res.*, **23**, 47, 1923.

(3) Scott (R.). — Methyl-anthranilate in grape beverages and flavors. *Ind. and Eng. Chem.*, **15**, 732, 1923.

(4) Sale (J.), Wilson (B.). — Distribution of volatile flavor in grapes and grape juices. — *J. Agr. Res.*, **33**, 301, 1926.

(5) Shaulis (N.), Robinson (W.). — The effect of season, pruning severity and trellising of some chemical characteristics of Concord and Fredonia grape juice. *Amer. Soc. Hort. Sc.*, **62**, 214, 1953.

(6 *a*) Holley (A.). — Research of the volatile constituents of grape, *Canner*, **113**, 10, 1951.

(6 *b*) Holley (R.), Stoyla (B.), Holley (A.). — The identification of some volatile constituents of Concord grape juice. *Food Res.*, **20**, n° 4, 326, 1955.

(7) Haagen-Smith (A.), Horosawa (F.), Wanng (T.). — Chemical studies on grapes and wines (Volatile constituents of Zinfandel grapes (Vitis Vinifera)). *Food Res.*, **14**, 472, 1949.

(8) Prostosserdov (N.). — *a*) Bases de Œnologie (Trad.). 49, 1955, Moscou, Pischepromizdat éd. — *b*) Ampelographia (Ampélographie). S. S. S. R., **1**, 419, 1946, Moscou, Pischepromizdat éd.

(9) Bayer (E.). — Aromastoffe des Weines. — I. Die Carbonsäuren des Weines und der Trauben. *Vitis*, **1**, n° 1, 34, 1957. — II. Aliphatische Aldéhyde des Weines und der Trauben. *Ibidem*, **1**, n° 2, 93, 1957.

(10 *a*) Windish (K.). — Die Chemischen Vorgänge Weines 1906, Stuttgart, Ulmer Verlag.

(10 *b*) Amerine (M.), Joslyn (M.). — Table Wines , 265, 1951. — Los Angeles, Univ. of California Press.

(10 *c*) Frolov-Bagreev (A.), Agabaliantz (G.). — Chimie du vin (Trad.), **85**, 1951, Moscou, Pischepromizdat éd.

(10 *d*) Amerine (M.). — Composition of wines. I. Organic constituents. *Advances in Food Res.*, **5**, 461, 1954, New York, Acad. Press.

(11) Koch (J.), Breker (E.). Zur Bestimmung und Bedeutung der Aromazahl bei naturreinen Appel und Traubensäften, *Z. für Lebensmittel-Untersuch. Forsch.*, **96**, 329, 1953.

(12) Diemair (W.), Lötzbeyer (E.). — Studien zur Chemie und Technologie der Trockengemüse, *Z. für Lebensmittel-Unters. Forsch.*, **88**, 593, 1948.

(13 *a*) Nilov (V.). — Méthode pour la détermination quantitative des substances aromatiques dans le raisin, les marcs et le moût (Trad.). Troudy Vses. Naouchno-Izsled. Instituta Vinodeliya i Vinogradarstva « Magaratch » (*Trav. Inst. Fed. de Rech. sur l'Œnologie, et la Viticulture Magaratch*), S. S. S. R., **4**, 165, 1953.

(13 *b*) Nilov (V.), Maltabar (V.). — Appréciation des sortes de raisin pour la production du cognac et détermination du moment de la récolte (Titre traduit). Troudy V. N. I. I. Viv. « Magaratch » (*Travaux de l'Inst. Sup. Rech. Œnol. Vit., Magaratch*) S. S. S. R., n° 5, 1957, « Konijatchnoe proïzvodstvo » (Production du Cognac). Moscou, Pischepromizdat éd.

(14) Deibner (L.), Rifaï (H.), Flanzy (M.). — Substances colloïdales des jus de raisin. Influence de différents modes de conservation sur leur stabilité. *Ann. Techn. Agric., I. N. R. A.*, **75**, n° 1, 1958.

(15) Flanzy (M.). — *a*) La désulfitation des vins et des jus de fruits. *Ind. Agr. Alim.*, **66**, 31, 1949. — *b*) Nouvelles bases de l'industrie du jus de raisin. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **33**, 139, 1947.

(16) Flanzy (M.), Bouzigues (L. me), Bouzigues (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Techn. Agric., I. N. R. A.*, **4**, 397, 1955.

(17 *a*) Jaulmes (P.), Espezel (P.). — Dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et les spiritueux. *Ann. Fals. Fraudes*, **23**, 235, 1935.

(17 *b*) Jaulmes (P.). — *Analyse des vins*, 418, 1951, Montpellier, Poulain éd.

(18) Mareca-Cortès (I.), De Campos Salcedo (M.). — Le dosage de l'éthanal dans les vins doux et les boissons analogues. *Ann. Fals. Fraudes*, **48**, 479, 1955.

(19) Deibner (L.), Benard (P.). — Effets de traitements thermiques à l'abri de l'air sur les qualités des vins doux naturels. *Ann. Techn. Agric.* I. N. R. A. 1957 (*à paraître*).

(20) Deibner (L.), Benard (P.). — Dosage de l'anhydride sulfureux total et de l'ion sulfurique dans les liquides organiques. Applications aux vins, aux jus de raisin et aux solutions de sucre cristallisé. — *Ind. Agr. Alim.*, **72**, 565, 673, 1955.

(21) Bouzigues (L. Mme). — Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Tech. I. N. R. A.*, **4**, 223, 1955.

(22) Flanzy (M.), André (P.). — L'évolution des techniques de désulfitation et l'élaboration des jus aromatisés. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **41**, 738, 1955.

DOSAGE DE L'ACIDE TARTRIQUE SOUS FORME DE BITARTRATE DE POTASSIUM DANS LES MOUTS ET LES VINS

PAR

E. NÈGRE, A. DUGAL et J. M. EVESQUE

Laboratoire de Recherches de Technologie
Centre de Recherches Agronomiques du Midi
École Nationale d'Agriculture de Montpellier.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Critique des anciennes méthodes basées sur la précipitation du bitartrate de potassium.

II. — Recherches personnelles.

A. — Étude des conditions les plus favorables à l'insolubilisation de l'acide tartrique sous forme de bitartrate de potassium.

a) Étude théorique.

b) Étude expérimentale.

B. — Recherche des conditions les plus défavorables aux facteurs d'erreur.

a) En milieux synthétiques.

1° Milieux simples.

2° Milieux complexes.

b) En milieux naturels : moûts et vins.

C. — Conclusions.

III. — Exposé d'une nouvelle technique.

A. — Mode opératoire.

B. — Comparaison avec les méthodes oxydimétriques et au racémate de calcium.

C. — Conclusions.

IV. — Résumé et conclusion.

V. — Bibliographie.

I. — CRITIQUE DES ANCIENNES MÉTHODES BASÉES SUR LA PRÉCIPITATION DU BITARTRATE DE POTASSIUM

Parmi les méthodes proposées pour doser l'acide tartrique dans les moûts et les vins, un certain nombre d'entre elles sont basées sur la précipitation de cet acide sous la forme de bitartrate de potassium, celui-ci étant alors titré par alcalimétrie.

L'insolubilisation du bitartrate de potassium est provoquée par l'addition d'un excès d'un sel de ce métal autre qu'un tartrate, combinée soit avec l'adjonction d'un mélange d'alcool éthylique et d'éther sulfurique (méthode BERTHELOT-DE FLEURIEU) ou d'alcool (méthode DUBAQUIÉ) diminuant la solubilité du sel acide à précipiter, soit avec une concentration du liquide suffisante pour réduire la quantité de bitartrate de potassium susceptible de rester en solution (méthode PASTEUR-REBOUL).

Ces méthodes, dont certaines, telle la dernière précitée, sont utilisées couramment dans de nombreux laboratoires, ont été soumises aux critiques suivantes dont on trouve l'essentiel dans le traité d'analyse de JAULMES (1).

1. Le bitartrate de K ne précipite pas complètement ; ce n'est que de façon approximative qu'une correction est faite par BERTHELOT-DE FLEURIEU en majorant le résultat du dosage de 0,2 g/l.

SEMICHON et FLANZY (3 *a*) citent pour un vin contenant 5, 24 g d'acide tartrique total, d'après la méthode KLING, des quantités d'acide tartrique, exprimé en bitartrate de K, restant dans le filtrat, de 2,12 g/l ; 0.84 g/l ; 1,07 g par litre de vin analysé respectivement par les méthodes BERTHELOT-DE FLEURIEU, PASTEUR-REBOUL, DUBAQUIÉ.

2. Une partie de l'acide tartrique précipite sous la forme de tartrate de Ca, d'autant plus que le liquide dosé contenait plus de ce métal ; elle échappe au dosage. Cette cause d'erreur intervient surtout, d'après PASTEUR (2), dans la technique BERTHELOT-DE FLEURIEU : « Le tartrate de chaux qui pourrait se former est relativement très soluble dans l'eau mère acide du vin évaporé. Il est bien plus soluble que le bitartrate de potasse, de telle sorte que, s'il y a excès de potasse dans l'eau mère, par rapport à la quantité d'acide tartrique total pouvant passer à l'état de bitartrate, c'est à l'état de bitartrate seulement que se déposera l'acide tartrique. Au contraire, le tartrate de chaux est peut-être plus insoluble que le bitartrate de potasse dans une liqueur éthéro-alcoolique. M. BERTHELOT signale en passant dans son mémoire la cause d'erreur que j'indique ; mais il n'insiste pas autant qu'elle le mérite. »

3. SEMICHON, FLANZY et Mlle LAMAZOU-BETBEDER (3) signalent que des malate acide, sulfate acide et phosphate acide de potassium précipitent, augmentant cette fois le résultat ; cela jouerait particulièrement dans le procédé PASTEUR-REBOUL.

Ces causes d'erreur se compensent parfois. De toutes façons, ces procédés « ne peuvent être qu'approximatifs » (JAULMES).

4. La méthode PASTEUR-REBOUL à laquelle on donne généralement la préférence est inapplicable aux vins sucrés et aux moûts, « le sucre donnant un résidu trop abondant et visqueux dans lequel le tartre acide cristallise très mal ».

JAULMES précise par contre qu'un des grands avantages du procédé PASTEUR est que l'acide tartrique estérifié est compté comme acide tartrique, alors que, dans tous les autres procédés, on le néglige. Il estime le procédé DUBAQUIÉ supérieur aux précédents dans le cas des vins doux.

Nous avons pensé (10) que l'amélioration de ces méthodes pouvait être essayée en se basant sur la ligne de conduite suivante :

1° Rechercher les conditions les plus favorables à la précipitation du bitartrate de potassium de façon à limiter autant que possible la proportion d'acide tartrique restant en solution.

2° Chercher ensuite à éviter la précipitation d'autres sels acides et éventuellement aussi, si possible, de tartrates neutres.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

A. — CONDITIONS LES PLUS FAVORABLES A L'INSOLUBILISATION DE L'ACIDE TARTRIQUE SOUS FORME DE BITARTRATE DE POTASSIUM

Accroitront son insolubilisation, les facteurs qui diminueront sa solubilité : un abaissement de température, l'addition à la solution d'un liquide miscible bien choisi.

Mais, pour un solvant déterminé et une température bien précisée, dans le cas d'une solution ayant un certain titre en acide tartrique, conditionneront l'insolubilisation de l'acide tartrique sous forme de bitartrate de potassium les facteurs qui tendront à accroître le produit :

$$[bit^-] \times [K^+]$$

c'est-à-dire la proportion d'acide tartrique total sous la forme d'ions bitartrates d'une part, la concentration en potassium d'autre part.

Il est logique d'ajouter un excès d'un sel de potassium comme le faisaient les auteurs précités, mais il apparaît utile aussi de choisir le pH le plus favorable.

a) Étude théorique précisant le pH optimum

Si nous appliquons au cas de l'acide tartrique et du bitartrate de K, c'est-à-dire à la première, puis à la deuxième fonction acide de l'acide tartrique, la relation approximative

$$\log \frac{[A^-]}{[AH]} = pH - pK$$

dans laquelle $[A^-]$ est la concentration en anions $[A^-]$ et [AH] la concentration moléculaire de l'acide supposé non dissocié, nous calculons les rapports :

$$\frac{[\text{ions bit}^-]}{[\text{mol. ac. tart.}]} \text{ et } \frac{[\text{ions tartrates}]^{--}}{[\text{ions bitartrates}]}$$

d'où nous pouvons déduire, en fonction du pH de la solution, les pourcentages d'acide tartrique en solution

à l'état de molécules non dissociées,
sous forme d'ions bitartrates,
sous forme d'ions tartrates.

Cela nécessite la connaissance des pK des deux fonctions acides de l'acide tartrique ; or, si, suivant GRIGNARD (16), les valeurs trouvées pour K_1, sont assez concordantes et voisines de 0,97, 10^{-3} à 25° (27), il n'en est plus de même pour K_2 qui, suivant les auteurs varie de

$$2{,}8\ 10^{-5}\ (26.28) \text{ à } 6{,}9\ 10^{-5}\ (29)$$

Pour KOLTHOFF et STENGER (14) il est : 2,9, 10^{-5} à 25°C.

Par ailleurs, leur détermination a été faite à 18, 20 ou 25°C et non au voisinage de 0°C qui nous intéresse plus particulièrement.

D'après BRUNEL (13) :

	K			pK		
	18°	20e	25°	18°	20°	25°
Ac. Tartrique 1	$9{,}7.10^{-4}$	$9.7.10^{-4}$		3,01	3,01	
Ac. Tartrique 2	$2{,}8.10^{-5}$		$2{,}9.10^{-5}$	4,55		4,54

Quoique les résultats de nos calculs ne pouvaient, par suite, avoir à première vue qu'une valeur indicative dans le cas particulier envisagé, il nous a néanmoins paru intéressant de les résumer ici.

Nous les avons faits en prenant pour base les valeurs suivantes pour les pK de l'acide tartrique (1) :

(1) Dans la suite du texte, deux nombres différents « x_2 ou x_1 » se faisant suite correspondront :
le premier à $pK_1 = 3{,}01$ et $pK_2 = 4{,}05$
le second à $pK_1 = 3{,}02$ et $pK_2 = 4{,}54$

	K_1	K_2	pK_1	pK_2	
18°C	97.10^{-5}	$8{,}9.10^{-5}$	3,01	4,05	Genevois et Rib-Gayon (11) (1)
25°C	$95{,}5.10^{-5}$	$2{,}9.10^{-5}$	3,02	4,54	Kolthoff (14)

Nous avons abouti dans ces conditions aux tableaux I et I *bis* suivants, d'après lesquels, en solution aqueuse, c'est aux pH 3,53 ou 3,78 que la proportion d'acide tartrique sous la forme d'ions bitartrates est maximum et que le milieu se trouvera donc le plus sursaturé en bitartrate de K.

Tableau I

Proportions d'acide tartrique (1) *(en mol. p. 100mol. d'acide Tartrique total) à l'état de molécules sous forme d'ions bitartrates et d'ions tartrates.*

pH :	2,7	3	3,4	3,45	3,5	3,52	3,53	3,54
Ac. tartrique .	66,2	48,3	24,9	22,5	20,1	19,26	18,82	18,40
Ions Bitartrates	32,35	47,5	61,3	62,1	62,3	62,34	62,34	62,34
Ions Tartrates.	1,45	4,2	13,8	15,4	17,6	18,40	18,84	19,26

pH :	3,55	3,56	3,6	3,65	4	4,5	5
Ac. tartrique .	17,97	17,55	15,9	14	5,2	0,7	0,1
Ions Bitartrates	62,33	62,28	62,0	61,8	50,1	26,0	10,1
Ions Tartrates.	19,70	60,17	22,1	24,2	44,7	73,3	89,8

Remarquons qu'aux pH ainsi calculés, les concentrations moléculaires en acide tartrique libre, non dissocié, et en ions tartrates (ou en sel tartrate neutre de potassium) sont égales de telle sorte que la cristallisation de bitartrate de potassium ne doit théoriquement pas s'accompagner d'une variation du pH de la solution.

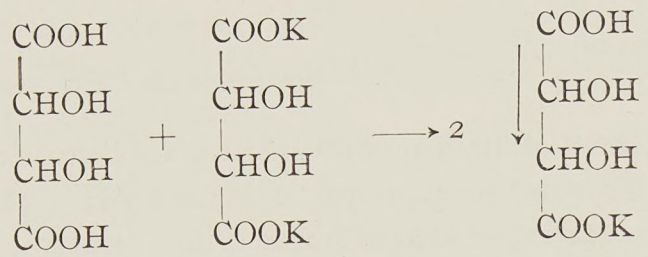
Tableau I *bis*

Proportions d'acide tartrique (2) *(en p. 100. mol. d'ac. tartrique total) à l'état de molécules et sous forme d'ions bitartrates et d'ions tartrates.*

pH	2,5	2,75	3,02	3,25	3,5	3,78	4,00	4,25	4,54
Ac. tartrique..	76,64	64,69	49,25	35,90	23,3	12,9	10,7	3,75	1,46
Ions Bitartrates	23,15	34,75	49,25	60,97	70,3	74,2	69,3	63,62	49,27
Ions Tartrates.	0,21	0,56	1,50	3,13	6,4	12,9	20	32,63	49,27

(1) Les pK des 2 fonctions de l'acide tartrique étant 3,01 et 4,05 (1).
(2) Les pK des 2 fonctions acides de l'acide tartrique étant 3,02 et 4,54 à 25°C d'après Kolthoff et Stenger. Volumétric Analysis, 1942.

En effet, tout se passe, tout au moins en solution aqueuse d'acide tartrique et de potasse, comme si elle s'accompagnait de la réaction :



d'après laquelle la concentration moléculaire de la solution en acide tartrique libre reste égale à la concentration moléculaire en tartrate neutre de potassium, ce qui n'est réalisé qu'à pH 3,53 d'après le tableau I, pH 3,78 d'après le tableau I bis. Donc, au cours de la cristallisation, la condition pH 3,53 ou 3,78 reste optimum.

La relation suivante

$$pH = \frac{1}{2}\left(pK_1 + pK_2 + \log \frac{[B_2]}{[C_1]}\right)$$

qui s'applique approximativement, selon la définition de BRONSTEDT des acides et des bases, à un mélange d'acide et de base appartenant à des couples différents, devient, dans le cas d'un ampholyte isoélectrique, comme le bitartrate de K :

$$pH = \frac{1}{2}\left[pK_1 + pK_2 + \log \frac{[A^{--}]}{[AH_2]}\right]$$

et puisque $[A^{--}] = [AH_2]$ en solution pure de ce sel :

$$pH = \frac{1}{2}[pK_1 + pK_2].$$

Ce pH apparaît approximativement indépendant de la concentration et égal à 3,53 et 3,78 suivant les pK adoptés.

Nous retrouvons ainsi facilement les résultats précédents, mais les nombres des tableaux I et I *bis* ont l'avantage de bien mettre en évidence les variations de concentration en fonction du pH, ce qui nous sera ultérieurement utile.

Jules VENTRE, en 1934 (4) avait signalé que, suivant la composition du milieu, la précipitation du bitartrate de potassium des vins s'accompagnait d'une élévation ou d'une diminution du pH ; d'après ses analyses, le pH intermédiaire entre ces deux effets contraires était voisin de 3,43. Le tableau II est un résumé des observations faites par cet auteur.

BIEDERMAN (5) signale les mêmes faits en 1951 et relate à cet égard le pH 3,5 pour les moûts et les vins, de COSTA (6) en 1952 distingue les cas des solutions aqueuses et des solutions alcooliques et arrive à la

conclusion que c'est entre pH 3,7 et 4 que les cristaux de bitartrate de K se forment le mieux dans les vins de 12 à 17° avec une clarification de ces liquides, facilitée du fait du phénomène colloïdal concomitant.

TABLEAU II

Avant précipitation					Après précipitation				
Milieux addit. des quantités suivantes d'acide tartrique g/l	Acidité totale	Acide tartrique en bit. de K	Potasse en bit. de K.	pH	Acidité totale	Acide tartrique	Potasse	pH	Variation du pH
0,50	4,30	4,37	7,32	3,45	3,60	1,70	4,90	3,50	— 0,05
1,00	4,50	5,00	7,32	3,42	3,80	1,90	4,62	3,40	— 0,02
1,50	4,80	5,63	7,32	3,40	4,10	2,00	4,05	3,35	— 0,05
2,00	5,20	6,25	7,32	3,30	4,20	2,08	3,40	3,20	— 0,1
2,50	5,50	6,88	7,32	3,20	4,40	2,18	3,00	3,15	— 0,05
3,00	5,80	7,50	7,32	3,10	4,55	2,36	2,50	3,05	— 0,05

Avant d'avoir pris connaissance des travaux de ces derniers auteurs, nous avons été amenés à chercher l'incidence :

1° De l'emploi d'une relation plus précise : celle de DUTOIT et DUBOUX.

2° De la teneur en alcool du milieu.

1° Calcul par les relations plus précises de DUTOIT et DUBOUX (8) (1).

En appliquant le raisonnement de ces auteurs au cas d'un biacide (tableaux III et III *bis*), nous avons obtenu des points remarquables légèrement différents l'un de l'autre.

TABLEAU III

Avec la formule de DUTOIT et DUBOUX.

	pH					
	3,4	3,42	3,45	3,5	3,52	3,55
Acide tartrique	18,40	17,36	15,86	13,48	12,48	11,18
Ions Bitartrates	65,19	63,38	65,55	65,60	65,59	63,35
Ions Tartrates	16,41	17,26	18,59	20,92	21,93	23,47

(Avec $pK_1 = 3,01$ et $pK_2 = 4,05$)

1° Le pHr, pour lequel il y a égalité de concentration moléculaire de l'acide tartrique libre et du tartrate neutre, point donc pour lequel la cristallisation de bitartrate de potassium ne doit pas provoquer de va-

riation de pH de la solution ; il se trouve égal à 3,43 ou 3,62 suivant les pK adoptés.

TABLEAU III *bis*

Calcul par la formule de DUTOIT et DUBOUX.

	pH											
	2,5	2,75	3,0	3,25	3,5	3,6	3,63	3,7	3,75	4,00	4,25	4,5
Acide tartrique	74,3	61,14	45,56	29,61	15,92	11,62	10,41	7,86	6,22	0,32		
Ions Bitartrates	25,44	38,18	52,90	66,62	75,72	78,37	78,72	79,35	79,38	75,14		
Ions Tartrates	0,26	0,68	1,54	3,77	8,36	10,01	10,87	12,79	14,39	24,54		

(Avec $pK_1 = 3,02$ et $pK_2 = 4,54$)

2° Le pHr' (3,5 ou 3,75) pour lequel la proportion d'acide tartrique sous forme de bitartrate de K est maximum ; elle n'est d'ailleurs que très légèrement différente de cette même proportion au pHr précédent.

Les conditions les meilleures pour la cristallisation du bitartrate de potassium doivent, certes, être celles pour lesquelles la sursaturation du liquide en ce sel est maximum, le pH étant celui (pHr') auquel correspond, dans la solution, la proportion maximum d'acide tartrique sous forme de bitartrate de K, mais il y a, d'autre part, intérêt à ce que ce pH ne varie pas, ou le moins possible, au cours de la cristallisation, ce qui doit, en raisonnant tout au moins sur des solutions pures de sels de potassium et d'acide tartrique, correspondre au cas où les concentrations en molécules non dissociées d'acide tartrique et en ions tartrates sont égales (pHr).

Ces pH remarquables n'étant pas parfaitement confondus et la proportion d'acide tartrique sous forme de bitartrate de K variant peu de l'un à l'autre, c'est logiquement le pHr qui nous intéresse plus particulièrement ; il conviendra pratiquement de se mettre en mesure de réaliser un pH aussi voisin que possible de lui, plutôt légèrement plus élevé que plus faible, de telle sorte que la concentration en ions H^+ tende, au cours de la cristallisation, à se rapprocher du point de solubilité minimum du bitartrate de K.

Les résultats obtenus par les relations de DUTOIT et DUBOUX diffèrent moins de ceux de la relation simple que ne diffèrent entre eux, par suite de l'indétermination de la valeur de pK, les nombres donnés par cette relation, nous n'aurons à leur attacher une importance particulière que dans la mesure où le pK_2 de l'acide tartrique aura été suffisamment bien précisé.

2° Influence de la teneur en alcool.

Dans le cas des solutions hydro-alcooliques, il convient de tenir compte de l'influence de l'alcool dont la constante diélectrique (7) D' = 25

est plus faible que celle de l'eau D = 80, de telle sorte qu'un électrolyte, à une concentration déterminée, y est, en solution, d'autant moins dissocié que le degré alcoolique est plus élevé.

En nous basant, pour la première fonction acide de l'acide tartrique, sur les constantes de dissociation établies par DUBOUX et TSAMADOS (9) que cite JAULMES (1),

Solvants	K_1	pK_1
Eau	97.10^{-5}	3,01
Alcool 9,6 %	76.10^{-5}	3,11
Alcool 19,2 %	46.10^{-5}	3,34

et en admettant que la constante de dissociation de la deuxième fonction acide de ce composé varie proportionnellement à celle de la première avec l'augmentation du degré alcoolique du solvant, ce qui donne pour pK_2 les valeurs correspondantes. :

Solvants	pK_2	pK'_2
Eau	4,05	4,54
Alcool 9,6 %	4,17	4,67
Alcool 19,2 %	4,49	5,02

(pK_2 en prenant point de départ 4,05 et pK'_2 : 4,54 en sol. aqueuse),

nous trouvons, pour des solutions hydro-alcooliques de 9 et 12° des pHr supérieurs à celui des moûts de 0,12 et de 0,18, donc des pHr d'environ 3,55 et 3,74 (vins de 10°) et 3,61 et 3,8 (vins de 12°), en prenant pour base les résultats obtenus pour les solutions aqueuses à partir des formules de DUTOIT et DUBOUX, (soit 3,43 et 3,62) pour lesquels apparaissent égales les concentrations en molécules libres d'acide tartrique et en ions tartrates.

b) Étude expérimentale

1° Détermination du pH optimum.

Il s'agissait de déterminer, pour les moûts et les vins, le pHr, pH qu'une cristallisation de bitartrate de K ne modifie pas.

Les variations de pH dues aux cristallisations naturelles de bitartrate de K de ces liquides étant trop faibles pour assurer une bonne sensibilité dans cette détermination, nous avons opéré en sens inverse en enrichissant, au contraire, ces liquides en bitartrate de K par addition d'une solution saturée à 90°-92°C de sel, quitte à tenir compte des variations de pH, — se compensant d'ailleurs partiellement — dues à la dilution et à la variation de température ainsi provoquée. La cristallisation eut lieu entre 15 et 20°C. Les déterminations des pH de chaque témoin et de chaque liquide lui correspondant après ce traitement se firent l'une à la suite de l'autre avec un pH-mètre à électrode de verre.

A 50 cm³ de chaque liquide soumis à l'expérience, nous avons ajouté 4 cm³ de solution aqueuse de bitartrate de K. Les divers liquides avaient été préparés à partir de moûts ou de vins amenés avec de l'acide tartrique et de la potasse à des pH variant de 3,15 à 4,70 puis placés 2 jours à + 5°C pour obtenir un état d'équilibre satisfaisant.

Les résultats que nous avons obtenus sont en partie exposés dans les tableaux IV et suivants comme si le phénomène s'était produit dans le sens de la cristallisation du bitartrate de potassium.

TABLEAU IV

Moûts.

Avant précipitation		Après précipitation		Variations de pH
Ac. totale calculée (1)	pH	Ac. totale dosée en méq/l	pH	
197	2,73	177	2,54	— 0,19
167	2,86	147	2,71	— 0,15
135	3,04	115	2,89	— 0,15
106	3,28	86	3,22	— 0,06
93	3,39	73	3,37	— 0,02
89	3,41	69	3,41	0
87	3,44	67	3,45	+ 0,01
85	3,45	65	3,47	+ 0,02
85	3,47	65	3,48	+ 0,01
79	3,51	59	3,57	+ 0,05
80	3,55	60	3,60	+ 0,05
77	3,62	57	3,70	+ 0,08
72	3,84	52	3,95	+ 0,11
75	4,36	25	4,55	+ 0,19

(1) La quantité de solution de bit. K ajoutée correspond à une augmentation d'acidité totale de 20 méq/l soit de 1 g/l exprimée en SO_4H_2.

TABLEAU V

Vin n° 2 désalcoolisé.

Avant précipitation		Après précipitation		Variations	
Ac. totale calculée en méq/l	pH	Ac. totale dosée en méq/l	pH	d'acidité totale en méq/l	de pH
106	3,17	85	3,10	19	— 0,07
101	3,25	82	3,20		— 0,07
98	3,29	79	3,25		— 0,04
95	3,32	76	3,30		— 0,02
94	3,35	75	3,35		0
91	3,40	72	3,40		0
88	3,44	69	3,45		+ 0,01
87	3,49	68	3,52		+ 0,03
85	3,51	66	3,55		+ 0,04
83	3,55	64	3,60		+ 0,05
82	3,57	63	3,62		+ 0,05
81	3,55	62	3,65		+ 0,10
79	3,60	60	3,70		+ 0,10
71	3,74	52	3,90		+ 0,16
66	3,78	47	4,00		+ 0,22
63	3,87	44	4,10		+ 0,23

1° Moût, tableau IV.
2° Vin n° 2 désalcoolisé (acidité totale 4,2 ; pH 3,00) (T.V.).
3° Même vin n° 2 de 1105 (T.VI) acidité totale 4,45 ; pH 3,13).
4° Vin n° 1 de 1105 (T.VII).

Tableau VI

Vin n° 2.

Avant précipitation		Après précipitation		Variations	
Ac. totale calculée en méq/l	pH	Ac. totale dosée en méq/l	pH	d'acidité totale en méq/l	de pH
138	3,13	119	2,99	19	— 0,14
113	3,30	94	3,20		— 0,10
108	3,35	89	3,24		— 0,11
108	3,37	89	3,28		— 0,09
105	3,37	86	3,30		— 0,07
105	3,41	86	3,35		— 0,06
102	3,45	83	3,40		— 0,05
101	3,48	82	3,45		— 0,03
100	3,53	81	3,51		— 0,02
97	3,54	78	3,52		— 0,02
97	3,55	78	3,55		0
96	3,58	77	3,58		0
95	3,61	76	3,62		+ 0,01
93	3,60	74	3,63		+ 0,03
91	3,65	72	3,70		+ 0,05
75	3,90	56	4,03		+ 0,13

Tableau VII

Vin n° 1.

Avant précipitation		Après précipitation		Variations	
Acidité totale en méq/l	pH	Acidité totale en méq/l	pH	d'acidité totale en méq/l	de pH
106	3,30	98	3,15	— 8	— 0,15
103	3,37	91	3,26	— 12	— 0,11
126	3,40	116	3,28	— 10	— 0,12
103	3,41	90	3,32	— 13	— 0,09
123	3,45	113	3,35	— 10	— 0,10
102	3,47	87	3,40	— 15	— 0,07
96	3,52	82	3,50	— 14	— 0,02
88	3,62	76	3,64	— 12	+ 0,02
98	3,74	90	3,74	— 8	+ 0
67	4,09	60	4,28	— 7	+ 0,19
52	4,31	37	4,70	— 15	+ 0,39

Voici *en résumé*, les zones de pH pour lesquelles celui-ci ne varie pas, aux erreurs d'expérience près, du fait de la cristallisation de bitartrate de potassium :

	Tableau	Résultats	Moyenne
Moût	IV	3,39 à 3,47	3,43
Vin n° 2 désalcoolisé	V	3,32 à 3,49	3,4
Vin n° 2 de 1105	VI	3,50 à 3,62	3,56
Vin n° 1 de 1105	VII	3,52 à 3,62	3,57

D'après ces expériences, le pHr des moûts et des vins désalcoolisés serait de l'ordre de 3,4 à 3,45 ; celui des vins de 11°5 de l'ordre de 3,56.

Le tableau VIII résume l'ensemble de ces résultats.

TABLEAU VIII

	Formule utilisée			Expérimentalement à 20° C	
	α pHr′ et pHr confondus	β		pHr	
		pHr′	pHr		
Par le calcul (1)					
Sol. aqueuse	3,53 ou 3,78	3,5 ou 3,75	3,43 ou 3,62		
Sol. alcoolique 9°	3,65 ou 3,90		3,55 ou 3,74		
Sol. alcoolique 12°	3,71 ou 3,96		3,61 ou 3,80		
					Moyenne
Moût				3,39 à 3,47	3,43
Vin N° 2 désalcoolisé				3,32 à 3,49	3,40
Vin N° 2 (11° 5)				3,50 à 3,62	3,56
Vin N° 1 (11° 5)				3,52 à 3,62	3,57

α : $\log \frac{[A^-]}{[AH]} = pH - pK$ β : formule de Dutoit et Duboux

(1) Le premier nombre correspond à $pK_1 = 3{,}01$ avec $pK_2 = 4{,}05$; le second à $pK_1 = 3{,}02$ avec $pK_2 = 4{,}54$.

Il convient de penser que les moûts de raisins mûrs doivent avoir des pHr très voisins les uns des autres et qu'il doit en être de même pour les vins de même degré ; cependant de très petites fluctuations peuvent résulter des teneurs variables de ces liquides en acide tartrique.

Les constantes de dissociation diminuant avec la température, à + 2°C, température que nous avons choisie pour la cristallisation du bitartrate de K en vue de l'analyse de l'acide tartrique dans ses solutions, le pHr à réaliser devrait être très légèrement plus élevé que ceux indiqués dans le tableau VIII.

Le $pK_2 = 4{,}05$ est en accord avec la théorie qui conduit à dire qu'approximativement la moyenne des 2 pK d'un biacide faible

$$\frac{pK_1 + pK_2}{2} = \frac{3{,}01 + 4{,}05}{2} = 3{,}53$$

est égale au pH d'une solution étendue et pure de son sel acide, pH 3,53 se trouvant être le pH de la solution aqueuse saturée vers 20°C de bitartrate de K pur, tel qu'on le détermine au potentiomètre.

Par contre, avec $pK_2 = 4{,}54$, on trouve 3,78.

Il apparaît aussi mieux concorder que 4,54 avec nos divers résultats expérimentaux à 20°C (tableau VIII, dernière colonne).

Le pH à 20°C étant donc 3,43, le pH optimum pour la cristallisation du bitartrate de K à + 2° C, doit en être voisin, très légèrement plus élevé.

2° Expérience montrant l'influence du pH sur le dosage de l'acide tartrique par la méthode PASTEUR-REBOUL.

Nous la fîmes sur un moût de raisins.

Celui-ci fut divisé en différents lots dont nous modifiâmes le pH par addition de doses variées mais connues d'acides organiques et de potasse, suivant le tableau IX.

Tableau IX

	Corps ajoutés	Milliéquivalents par litre		
		a	*b*	*c*
Témoin T.....		0	0	0
Série I.....	Potasse	20	40	60
Série II.....	Acide tartrique	20	40	60
Série III.....	Potasse	20	40	60
	et acide tartrique	20	40	60
Série IV.....	Potasse	20	40	60
	et acide malique	20	40	60

Immédiatement, puis après repos, afin de laisser précipiter l'excès de bitartrate de potassium, les pH et acidités (en présence de phénolphtaléine) de ces liquides furent déterminés, en même temps que furent effectuées les prises destinées au dosage de l'acide tartrique et de la potasse par la méthode Pasteur-Reboul que nous modifiâmes légèrement en ajoutant deux fois plus de solutions de bromure de potassium ou d'acide tartrique que n'indiquent ces auteurs pour le cas des vins ; nous voulions nous assurer d'un excès suffisant de ces corps, les moûts étant plus riches que les vins en acide tartrique et en potassium.

Nous donnons dans le tableau X, les différences, pour l'acide tartrique, exprimé en milliéquivalents de bitartrate de K par litre, entre

Tableau X

Numéros des échantillons	pH des moûts	En méq/l (moût témoin supposé exact)	En méq/l (résultat du moût de pH 3,45 supposé exact)
II*c*	2,94	— 5	— 11
II*b*	3,05	— 1	— 7
II*a*	3,16	+ 2,25	— 3,75
T	3,26	0	— 6
III*a*	3,45	+ 6	0
IV*a*	3,55	+ 4	— 2
I*a*	3,65	— 0,25	— 6,25
III*b*	3,75	+ 3	— 3
IV*b*	3,75	+ 1	— 5
III*c*	3,80	— 5,75	— 11,75
IV*c*	3,90	+ 4,5	— 1,5
I*b*	4,04	— 6,4	— 12
I*c*	4,45	— 12,75	— 18,75

les résultats obtenus par ce dosage et les résultats calculés en admettant exacts, tout d'abord le dosage du moût témoin, puis celui du moût de pH 3,45.

Les moûts sont classés d'après les valeurs croissantes des pH.

On constate que :

1° Ces différences sont, dans l'ensemble, d'autant plus grandes que le pH s'éloigne davantage de la zone de pH 3,26 ; 3,65.

2° Le résultat maximum est obtenu pour le pH 3,45, c'est-à-dire au pH précédemment déterminé expérimentalement comme devant être le plus favorable à la précipitation du bitartrate de K dans les moûts.

3° Quelques résultats apparaissent aberrants : au pH 3,90 se rencontre un nouveau maximum ; en remarquant l'addition importante (60 méq/l) d'acide malique qu'a justement subi ce moût et que son pH est assez favorable à la précipitation de bimalate de K (le pH le plus favorable à la précipitation de ce sel étant théoriquement de l'ordre de 4,2), on peut penser qu'une telle précipitation a pu se produire de façon exagérée, jusqu'à presque compenser la déficience de précipitation du bitartrate de K.

A des pH plus bas, rien ne permet d'affirmer qu'une telle précipitation, certes, plus faible, n'a pu se produire.

3° Expérience montrant l'avantage de tamponner le milieu à un pH voisin de 3,5.

L'étude précédemment faite a montré que le pH optimum de cristallisation à + 2° C est légèrement supérieur à 3,43; il y a intérêt de toutes façons, avons-nous vu, à réaliser un pH un peu plus élevé plutôt qu'inférieur à celui-ci, tel qu'il ne dépasse pas autant que possible pHr' qui est légèrement supérieur à 3,5.

Ce pH optimum varie d'ailleurs dans une très faible mesure, avec les milieux; de plus il n'est pratiquement pas possible de l'obtenir de façon parfaite dans les conditions d'une analyse, étant donné les compositions variées des liquides à doser.

Nous adopterons par suite le pH 3,5; nous verrons qu'il donne satisfaction malgré certains facteurs perturbateurs. En présence d'alcool, il faudra tamponner le milieu à un pH un peu plus élevé, fonction du degré.

Pour réaliser aussi bien que possible ces pH, un tampon formique « acide formique + potasse » (pK de l'acide formique 3,69), paraît particulièrement indiqué ; il agira en effet, dans les conditions voisines de celles où son pouvoir tampon est maximum.

L'étude suivante a été faite, néanmoins aussi avec :

un tampon acétique (pK de l'acide acétique = 4,76) ;

et un tampon citrique (pK des 3 fonctions de l'ac. citrique 3,08 ; 4,75 ; 6,41).

La composition de ces tampons est indiquée chapitre III.

La valeur de ces solutions du point de vue de l'insolubilisation de l'acide tartrique n'est pas fonction seulement de leur pouvoir tampon, mais aussi de l'excès de cations potassium qu'elles apportent avec elles.

On pourrait les améliorer à ces égards en accroissant leur concentration, mais l'augmentation de la viscosité du milieu pourrait gêner la cristallisation du bitartrate de K et les risques d'entraînement d'acides par celui-ci pourraient être accrus.

Le tampon formique paraît préférable à la fois du fait de son pouvoir tampon théoriquement élevé et à cause de l'excès de potasse qu'il apporte avec lui ; pour une concentration voisine d'acide, le tampon citrique en fournit un peu moins ; le tampon acétique, quoique 2 fois plus concentré, pour tenir compte de ce que le pH prévu est assez éloigné du pK de cet acide, presque 2 fois moins.

L'expérience suivante, tableau XI, effectuée en dosant un même moût préalablement divisé en différents lots additionnés de proportions variées d'acide tartrique ou d'acide malique apparaît particulièrement favorable à notre méthode puisqu'elle semble même éviter l'effet perturbateur du bimalate de K ; elle l'est aussi, quoique un peu moins, à la méthode DUBAQUIÉ mise en application suivant le mode opératoire indiqué par JAULMES (1).

Mais d'autres expériences montrèrent que l'acide malique influe légèrement ; nous fûmes de ce fait conduits à continuer notre expérimentation en milieu synthétique.

B. — RECHERCHE DES CONDITIONS LES PLUS DÉFAVORABLES AUX FACTEURS D'ERREUR

En tamponnant le milieu au pH le plus favorable à la précipitation du bitartrate de K, on peut espérer remédier au principal défaut de la méthode PASTEUR-REBOUL.

Il convient d'autre part de chercher à préciser les autres causes d'erreur et de tâcher d'en limiter autant que possible les effets.

Elles paraissent pouvoir être classées comme suit :

1° Facteurs influant sur la solubilité et la vitesse de cristallisation du bitartrate de K : concentration en acide tartrique et autres corps en solution, nature des solvants (eau, alcool etc.), facteurs de viscosité (sucres), présence de colloïdes protecteurs.

2° Entraînement d'acides ou précipitation de sels acides autres que le bitartrate de K.

TABLEAU XI

	Additionné d'acide tartrique				Moût témoin	Additionné de KOH			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Méq/l d'acide tartrique ou de potasse ajoutés.....	80	60	40	20	0	20	40	60	80
Acidité totale en méq/l dès l'addition	174	154	137,0	120	100	78	60	40	20
Acidité totale en méq/l après précipitation du bit. K	167	146	130	116	98	70	50	40	20
pH après précipitation de bit. K.....	2,76	2,81	2,94	3	3,15	3,45	3,70	4,25	4,90
Bit. de K en méq/l ayant précipité avant prélèvement pour le dosage	7	8	7	4	2	8	10	0	0
Bitartrate de K en méq/l	34,5 + X	24 + X	16 + X	9 + X	X	X — 6	X — 8	X + 2	X + 2
Bit. de K dosé en méq/l :									
Méth. Dubaquié	68,8	58	50,8	45,2	37,6	27,8	28,2	35,6	34,8
— au tampon	69,75	60	53	45	36	27,5	27	37,5	36,5
— Pasteur-Reboul	60	53	50,5	46,25	40,25	30	28	29	13,25
Bit. de K calculé, en méq/l en prenant pour base la moyenne des résultats obtenus pour les nº 6, pH 3,45 et 7, pH 3,7						37	37	37	37
Soit : dès l'add. de l'Ac. t. ou de la potasse lors du prél. pour le dosage.....	69,5	59	51	44	35	29	27	37	37
Différence avec les rés. obtenus par dosages directs :									
Dubaquié, rés. calc.	— 0,7	— 1	— 0,2	+ 1,2	+ 2,6	— 1,2	+ 1,2	— 1,4	— 2, 2
Tampon, rés. calc.	+ 0,25	+ 1	+ 2	+ 1	+ 1	— 1,5	0	+ 0,5	— 0,5
Pasteur-Reboul	— 9,5	— 6	— 0,5	+ 2,25	+ 5,25	+ 1	+ 1	— 8	— 23,75

Conclusions :

Erreurs absolues
- Dubaquié ± 2,6 méq entre les pH 2,76 et 4,90 des moûts
- Tampon ± 2 entre les pH 2,76 et 4,90 des moûts
- Pasteur Reboul ± 6 entre pH 2,8 et 4 env. ± 9,5 entre pH 2,7 et 4,25

La méthode Dubaquié et notre méthode au tampon donnent donc de bons résultats pour des pH du moût compris entre 2,75 et 4,9.
La méthode Pasteur Reboul a donné des résultats bien moins réguliers.

3° Précipitation de tartrates neutres, plus particulièrement de tartrate de Ca.

4° Maintien en solution d'acide tartrique sous forme de complexes solubles.

Cependant, le grand nombre de facteurs susceptibles d'influer, ne nous ayant pas permis d'y voir, dès le début, suffisamment clair pour expérimenter d'une façon aussi systématique et complète que nous l'aurions souhaité, nous nous sommes axés sur les facteurs qu'il nous paraissait le plus utile d'étudier dans le cadre de notre but principal du moment : l'amélioration de la méthode PASTEUR-REBOUL.

Nous avons envisagé l'étude de cette question en solutions synthétiques d'abord, puis en milieux naturels, moûts et vins.

a) Étude en milieux synthétiques

1. — Milieux simples.

a) FACTEURS DE VITESSE DE CRISTALLISATION ET DE PURETÉ DES CRISTAUX

Nos essais sur milieux synthétiques ont été faits, en premier lieu, pour rechercher les conditions permettant, sans nuire à l'entière précipitation de l'acide tartrique sous forme de bitartrate de K, de réduire autant que possible l'influence de l'acide malique.

C'est ainsi que nous avons été conduits d'abord à étudier l'*influence de la concentration* en admettant qu'elle sera semblable dans les moûts et les vins traités de façon identique ; cela paraissait probable pour les moûts, relativement riches en acide tartrique, dans la mesure où les sucres n'auraient pas d'effet perturbateur, pour les vins sains normalement sursaturés en bitartrate de potassium ou voisins de la saturation, moins certain dans le cas des vins attaqués par les bactéries de l'acide tartrique ou désalcoolisés au cours de la manipulation.

Nous avons ensuite recherché l'*influence de l'alcool,* puis de la concentration et de l'addition d'alcool combinés.

Il convenait, dans chaque cas particulier, pour s'assurer une cristallisation complète du bitartrate de K, d'étudier la durée utile de la cristallisation, celle-ci étant toujours effectuée à la température de + 2°C.

C'est ce qui explique, sans oublier les tâtonnements difficilement évitables pour une recherche de cet ordre, dans laquelle interviennent plusieurs facteurs dont l'importance relative n'est pas encore connue, que nous n'ayons pu en faire des études parfaitement distinctes.

Mises à part les modifications effectuées pour faire varier les facteurs en cause, le mode opératoire utilisé fut le suivant :

Prise de solution d'acide tartrique : 20 cm³ ; concentration ou non ;

addition ou non d'alcool ; addition de 4 cm³ de solution tampon ; repos à la température de 2°C pendant 2, 4, 6 ou 8 jours. Séparation des cristaux par filtration sur verre frité n° 3 ; lavage avec une solution alcoolique à 50°, saturée de bitartrate de K ; dissolution dans de l'eau bouillante et titrage par une solution titrée de soude $\frac{N}{20}$ non carbonatée.

α) Influence des sucres et des colloïdes

1er *ESSAI. — Etude de l'influence des sucres.*

Elle a été faite avec une solution de composition suivante :

S { Bitartrate de K ..... 33,8 méq/l
S { Glucose ..... 222 g/l

Les résultats résumés dans le tableau XII montrent que le glucose n'a pas d'effet défavorable ; si la cristallisation du bitartrate est très légèrement moins rapide, le résultat déterminé au bout de 4 jours ne se trouve pratiquement pas modifié.

Tableau XII

	Durée de la cristallisation			
	2 jours		4 jours	
	Bit. K en méq/l	Δ	Bit. K en méq/l	Δ
Tampon acétique + alcool				
Témoin	33,43 ± 0,06	—0,4	33,5 ± 0	—0,3
Sol. S.....	32,6 ± 0,1	—1,2	33,5 ± 0	—0,3
Tanpon acétique Concentration à 7 cc				
Sol. S.....			34 ± 0	+0,2
Tampon citrique Concentration à 7 cc				
Témoin			33,8 ± 0,5	0
Sol. S.....			33,5 ± 0	—0,3

2e *ESSAI.— Etude de l'influence des colloïdes.*

Nous avons tâché de nous en rendre compte par addition de gomme arabique.

Composition de la solution A :

Bitartrate de k..... 29,87 meq/l
gomme arabique ..... 4 gr/l

Résultats : Consulter le tableau XII *bis*.

On constate une légère influence de cette gomme sur le dosage, mais seulement de l'ordre du demi milliéquivalent par litre.

En étudiant la vitesse comparée de cristallisation de solutions pures de bitartrate de potassium, contenant ou non de la gomme arabique,

nous avons constaté que cette dernière retardait légèrement la cristallisation de ce sel acide.

TABLEAU XII *bis*

	Durées de cristallisation			
	4 jours		7 jours	
	Bit. K en méq/l	Δ	Bit. K en méq/l	Δ
Méthode sans concentration :				
Tampon acétique				
Sol. témoin	29,81 ± 0,06	— 0,06	29,87	0
Sol. A	29,25 ± 0,25	— 0,62	29,81	— 0,06
Tampon formique				
Sol. témoin	30,31 ± 0,19	+ 0,44	30,75	+ 0,88
Sol. A	29,81 ± 0,06	— 0,06	30,56	+ 0,69
Méthode avec concentration :				
Tampon acétique				
Sol. témoin	29,5 ± 0	— 0,37	30	+ 0,13
Sol. A	29 ± 0	— 0,87	29,62	— 0,25
Tampon citrique				
Sol. témoin	28,18 ± 0,06	— 1,69	28,87	— 1,00
Sol. A	27,93 ± 0,18	— 1,94	28,43	— 1,44
Tampon formique				
Sol. témoin	29,87 ± 0	0	30,75	+ 0,88
Sol. A	29,37 ± 0,12	— 0,5	30,06	+ 0,19

Quoique l'on ne puisse généraliser avec certitude ces résultats aux colloïdes du vin, on peut en déduire que ces derniers doivent exercer une influence retardatrice suffisamment limitée pour que l'erreur en résultant reste dans des limites admissibles.

Cette influence a été montrée, d'ailleurs, par RIBEREAU-GAYON dans le cas de la dextrane (expériences sur des suspensions de Kaolin (2 *a*)

β) INFLUENCE DE FACTEURS SUIVANTS

Acide malique,
Concentration,
Teneur en alcool,
Durée de cristallisation.

α') Solutions de bitartrate de K voisines de la saturation à la température du Laboratoire.
β') Etude des facteurs de perturbation de l'acide malique.
γ') Cas de solutions diluées de bitartrate de K

α') Solutions de bitartrate de K voisines de la saturation à la température du Laboratoire.

1er *ESSAI. — Influence de l'acide malique, de la concentration et de l'alcool.*

Solutions préparées.

A. — Solution aqueuse de bitartrate de K à 34,5 méq/l.
B. — Solution A + acide malique (50 méq/l).
C. — Solution A + acide malique (100 méq/l).

Méthodes de dosage utilisées.

20 cm³ de solution à doser + 4 cm³ de solution tampon au citrate de K.

a) Concentration poussée (comme PASTEUR-REBOUL).

b) Concentration moindre (résidu 7 cc).

c) Pas de concentration, mais addition de 20 cm³ d'alcool.

Durée de cristallisation : 8 jours.

Résultats : Voir le tableau XIII.

TABLEAU XIII

	Bit. de K en méq/l				
	A	B	Influence de l'ac. malique	C	Influence de l'ac. malique
a)	34,85	38	3,15	40,25	5,4
b)	34,5	34,75	0,25	35,25	0,75
c)	34,5	39	4,5	41,25	6,75

L'effet du bimalate de K est net lorsqu'on pousse la concentration comme on a l'habitude de le faire par la méthode PASTEUR-REBOUL ; elle reste inférieure à 1 méq/l lorsqu'on se contente d'amener les 20 cm³ de moût prélevés, plus le tampon, au volume de 7 cc.

La précipitation par 20 cc d'alcool sans concentration, entraîne de l'acide malique.

2e *ESSAI. — Influence de l'acide malique, de la concentration et de la durée de cristallisation.*

Il convient de savoir si l'on peut concentrer encore moins que précédemment.

Solutions préparées.

A. — Solution aqueuse de bitartrate de K à 30 méq/l.

B. — Solution A + 50 méq/l d'acide malique.

C. — Solution A + 100 méq/l d'acide malique.

Méthodes de dosage utilisées.

20 cm³ de solution à doser + 4 cm³ de solution tampon.

a) Pas de concentration.

Durées de cristallisation :

1° 2 jours,

2° 4 jours,

3° 8 jours.

b) Concentration plus ou moins poussée.

Durée de cristallisation : 8 jours.

4° Diminution du volume du liquide du quart de son volume primitif.

5° Concentration de 50 p. 100.

6° Le volume du liquide est ramené à 7 cc.

Résultats : Consulter le tableau XIV.

TABLEAU XIV

Bit de K en méq/l.

	A		B			C		
		Δ		Δ	δ		Δ	δ
a) *Sans concentration:*								
Tampon acétique (pH 3,5) :								
1. 2 jours	26,5	— 3,5	26,75	— 3,25	+ 0,25	26	— 4	— 0,5
2. 4 jours	27	— 3	28	— 2	+ 1	24,25	— 5,75	— 2,75
3. 8 jours	27,75	— 2,25	27,75	— 2,25	0	26,75	— 3,25	— 1
Tampon citrique (pH 3,5) :								
1′. 2 jours	23,62	— 6,38	23,55	— 6,45	— 0,1	19,05	— 10,9	— 4,57
2′. 4 jours	25,75	— 4,25	21,5	— 8,5	— 4,2	23,25	— 6,75	— 2,5
3′. 8 jours	25,5	— 4,5	24,25	— 5,75	— 1,25	21,75	— 8,25	— 3,75
b) *Avec concentration* (8 jours) :								
Tampon acétique (pH 3,5) :								
4. 1/4 en moins	28,75	— 1,25	30	0	+ 1,25	30,75	+ 0,75	+ 2
5. A moitié	27,87	— 2,13	29,5	— 0,5	+ 1,63	30,75	+ 0,75	+ 3,1
6. 7 cc restant	29,25	— 0,75	30,75	+ 0,75	+ 1,5	31,25	+ 1,25	+ 2
Tampon citrique (pH 3,5) :								
4′. 1/4 en moins	27,5	— 2,5	27,5	— 2,5	0	29,5	— 0,5	+ 2
5′. A moitié	28	— 2	29	— 1	+ 1	29,5	— 0,5	+ 1,5
6′. 7 cc restant	29,75	— 0,25	30,25	+ 0,25	+ 1,5	30,25	+ 0,5	+ 0,5

Δ = différence entre la quantité d'acide tartrique dosée et la quantité de ce corps existant réellement dans la solution.
δ = influence de l'acide malique.

Conclusion.

Sans concentration.

1° La précipitation du bitartrate de K est incomplète.

2° Plus facile en présence du tampon acétique que du tampon citrique.

3° Gênée par l'acide malique.

Avec concentration.

La précipitation de bitartrate de K n'est suffisante qu'à condition de pousser la concentration jusqu'à ce que la solution résiduelle n'occupe plus que 7 cm³.

L'effet de l'acide malique, pour une solution ayant une teneur relativement élevée en ce corps (100 méq/l), paraît susceptible d'atteindre 2 méq/l, mais pour des teneurs plus normales, 1 à 1,5 méq/l.

Dans ces conditions, il y a compensation partielle des erreurs ; l'erreur absolue qui est de -0,25 et -0,75 du fait du bitartrate de K reste inférieure à 1 méq/l (0,25 et 0,75) dans le cas de 50 méq. d'acide malique/l et 1,25 dans le cas de la solution deux fois plus concentrée en acide malique.

Nous verrons qu'en limitant à 6 ou à 4 jours la durée de la cristallisation, on amène à moins d'1 méq/l l'erreur due au bimalate de K en obtenant néanmoins une cristallisation suffisamment complète du bitartrate de K.

3e *ESSAI. — Influence de l'acide malique, de la concentration, de l'addition d'alcool et de la durée de cristallisation.*

Titre de la solution de bitartrate de K : 28,5 méq/l.
Tampon acétique pH 3,5.

Résultats : Consulter le tableau XV.

TABLEAU XV

	A	B	C
Sans concentration mais addition d'alcool			
a) + 5 cc d'alcool			
2 jours	25,25	26	26,5
4 jours	28,37	28,5	28
b) + 7,5cc d'alcool			
2 jours	28,37	26,75	26,25
4 jours	28,5	29,25	30
c) + 10 cc d'alcool			
2 jours	28,5	29,25	29,25
4 jours	27,36	28,56	27,84
Avec concentration			
d) Jusqu'à 10 cc de résidu			
2 jours	26,5	26,75	27,5
4 jours	28,25	27,84	29,75
e) Jusqu'à 7 cc de résidu			
2 jours	28	28,25	27,5
4 jours	29,25	29,75	29,52

Conclusions.

1° Sans concentration, avec addition d'alcool (5 à 10 cc), les résultats sont bons pour 4 jours de cristallisation.

2° En concentrant jusqu'à 10 cc ou 7 cc de résidu, les résultats sont bons avec 4 jours de cristallisation, sans effet net de l'acide malique.

Ils sont bons, même pour 2 jours de cristallisation dans le cas de la concentration la plus poussée (7 cc de résidu).

4e *ESSAI. — Influence de l'acide malique, de l'addition d'alcool, de la concentration, de la durée de la cristallisation.*

Résultats : Consulter le tableau XVI.

Tableau XVI

	A	B	C
Dosage direct	23,87		
Sans concentration, addition d'alcool:			
Tampon acétique :			
a) + 5 cc d'alcool:			
2 jours	23,75 ± 0	24,28	24,13
4 jours	23,83 ± 0,04	23,56	24,28
6 jours	24,06 ± 0,06	25,6	25,48
Tampon acétique :			
b) + 7,5 cc d'alcool:			
2 jours	23,75 ± 0	24,76	24,52
4 jours	24 ± 0	25,84	24,88
6 jours	23,87 ± 0	25,96	26,32
c) + 10 cc d'alcool:			
2 jours	23,87 ± 0,12	25,36	25,24
4 jours	24,06 ± 0,06	26,2	26,56
6 jours	24,87 ± 0,06	26,44	26,68
Tampon citrique :			
a) 2 jours	20,9 ± 0,1		
4 jours	22,18 ± 0,18		
6 jours	24,12 ± 0,13		
b) 2 jours	22 ± 0,25		
4 jours	24 ± 0		
6 jours	24,93 ± 0,07		
c) 2 jours	22,87 ± 0,12		
4 jours	24,37 ± 0,12		
6 jours	25,37 ± 0,12		
Avec concentration:			
Tampon acétique :			
d) *A moitié:*			
2 jours	23,25 ± 0,25	25,24	23,32
4 jours	23,25 ± 0	23,56	23,8
6 jours	23,56 ± 0,31	23,32	23,32
e) *Jusqu'à 7 cc:*			
2 jours	24 ± 0	25	24,76
4 jours	23,87 ± 0,12	22,72	24,04
6 jours	24,12 ± 0,65	24,16	24,76
f) *Jusqu'à 7 cc + 2 cc d'alcool à 95° (degré obtenu : 14°6):*			
2 jours	24,02 ± 0,22		
4 jours	23,62 ± 0,13		
6 jours	23,43 ± 0,06		
Tampon citrique :			
d) *A moitié:*			
2 jours	22,56 ± 0,56		
4 jours	23,27 ± 0,03		
6 jours	23,18 ± 0,32		
e) *A 7 cc:*			
2 jours	23,31 ± 0,2		
4 jours	24 ± 0		
6 jours	23,43 ± 0,07		
f) 2 jours	23,87 ± 0,25		
4 jours	23,68 ± 0,18		
6 jours			

Conclusions.

1° La cristallisation est complète en 4 jours (ou même en 2 jours dans le cas du tampon acétique), après simple addition d'alcool (5 à 10 cc d'alcool pour 20 cc de moût et le tampon correspondant).

Il faut compter 5 à 6 jours de cristallisation dans le cas du tampon citrique, lorsqu'on n'emploie que 5 cc d'alcool.

Sous l'action de l'alcool, du bimalate de K précipite ; cette précipitation apparaît cependant faible au bout de 4 jours pour l'addition de 5 cc ou 7,5 cc d'alcool ; elle se montre alors inférieure au méq/l, un peu plus élevée (1,5 méq/l) au bout de 6 jours.

En présence d'alcool, le pH 3,5 ne réalise pas des conditions suffisamment favorables à l'insolubilisation du bitartrate de K.

2° La concentration à moitié ne suffit pas pour permettre la précipitation de tout le bitartrate de K de la solution ; par contre, elle est réalisée en 2 jours lorsqu'on concentre jusqu'à 7 cc de résidu, avec le tampon acétique, en 4 jours avec le tampon citrique.

L'influence de l'acide malique est très faible dans ces conditions.

Quant au procédé comportant, après concentration jusqu'à 7 cc, l'addition de 2 cc d'alcool, il donne, en 2 jours de cristallisation, satisfaction.

En résumé :

D'après l'expérimentation précédente,

— mis à part ce dernier procédé qu'il sera intéressant d'essayer dans le cas des vins qui, certes, en général sont saturés ou sursaturés en bitartrate de potassium, mais peuvent ne plus l'être après élimination de l'alcool — deux modes opératoires apparaissent intéressants, car ils aboutissent à la cristallisation de tout le bitartrate de K avec une erreur faible en évitant en particulier dans la limite d'un méq/l, l'influence perturbatrice de l'acide malique.

5e *ESSAI*

Nous avons voulu nous bien assurer de leur intérêt.

Modes opératoires :

a) Addition de 5 cc d'alcool à 20 cc de solution à doser ; pas de concentration ; addition de 4 cc de solution tampon.

b) Concentration des 20 cc de solution à doser à 7 cc et addition de 4 cc de solution tampon.

Solutions préparées :

A. — Solution de bitartrate de K à 19,5 méq/l.

B. — Même solution + 50 méq/l d'acide malique.

C. — Même solution + 100 méq/l d'acide malique.

Résultats : Consulter le tableau XVII.

Conclusions.

1° Les erreurs dues au manipulant sont très faibles, inférieures au demi milliéquivalent par litre.

Tableau XVII

	A		B			C		
		Comparaison du résultat titré direct		Influence de l'ac. malique	Comparaison du Rés. titré dir.		Influence de l'ac. malique	Comparaison du rés. titré direct
Tampon Acétique								
Avec 5 cc d'alcool								
2 jours.....	19,25 ± 0,25	— 0,25	19,68 ± 0,32	+ 0,43	+ 0,18	19 ± 0,5	— 0,25	— 0,5
4 jours.....	19,37 ± 0,12	— 0,13	20 ± 0	+ 0,63	+ 0,5	19,87 ± 0,13	+ 0,5	+ 0,37
6 jours.....	19 ± 0	— 0,5	20,10 ± 0,15	+ 1,1	+ 0,6			
Concentration 7cc								
2 jours.....	18,43 ± 0,44	— 1,07	19,75 ± 0,25	+ 1,32	+ 0,25	20,25 ± 0,5	+ 1,82	+ 0,75
4 jours.....	19 ± 0,25	— 0,5	20,37 ± 0,13	+ 1,37	+ 0,87	20,37 ± 0,13	+ 1,37	+ 0,87
6 jours.....	19 ± 0	— 0,5	20,1 ± 0,7	+ 1,1	+ 0,6	21 ± 0	+ 2	+ 1,5
Tampon Citrique								
Concentration 7cc								
2 jours.....	18,81 ± 0,12	— 0,19	20 ± 0	+ 1,2	+ 0,5	19,5 ± 0,25	+ 0,7	0
4 jours.....	19,43 ± 0,32	— 0,07	19,87 ± 0,13	+ 0,44	+ 0,37	20,06 ± 0,45	+ 0,63	+ 0,56
6 jours.....	19,5 ± 0	0	20,5 ± 0	+ 1,0	+ 1	20,62 ± 0,12	+ 1	+ 0,12

Tableau XVIII

Analyse titrimétrique directe du témoin 26,87 méq/l. Tampon formique.	Une seule cristallisation			Double cristallisation					
				4 jours			6 jours		
		Δ	Δ′		Δ	Δ′		Δ	Δ′
pH 3,8 + 16°3 alcool									
Témoin T.....	26,31 ± 0,06	— 0,56		25,75 ± 0,25	— 1,12		26,0 ± 0,25	— 0,87	
T + ac. malique (80 méq/l).	28,19 ± 0,19	+ 1,32	+ 1,88	25,75 ± 0,25	— 1,12	0	25,75 ± 0,5	— 1,12	0
pH 4 + 20° alcool									
Témoin T.....	26,64 ± 0,12	— 0,23		26,37 ± 0,12	— 0,5		26,25 ± 0	— 0,62	
T + ac. malique.....	29,25 ± 0	+ 2,38	+ 2,61	26,39 ± 0,14	— 0,48	0	26,39 ± 0,14	— 0,48	0
pH 4 + 25° alcool									
Témoin T.....	27,25 ± 0	— 0,38		26,87 ± 0,12	0		26,97 ± 0,12	+ 0,1	
T + acide malique	29,88 ± 0,38	+ 3,01	+ 3,39	27,5 ± 0	+ 0,63	+ 0,63	27,5 ± 0	+ 0,63	+ 0,53
pH 4 + 30° alcool									
Témoin T.....	27,62 ± 0,12	+ 0,75		26,99 ± 0,12	+ 0,12		26,86 ± 0,11	— 0,01	
T + ac. malique.....	30,37 ± 0,12	+ 3,5	+ 2,75	27,87 ± 0,12	+ 1,0	+ 0,88	27,37 ± 0,12	+ 0,5	+ 0,49

Δ′ = influence de l'acide malique.

2° Avec une erreur inférieure au demi milliéquivalent par litre, la totalité du bitartrate de K a précipité :

en 2 jours avec 5 cc d'alcool,

en 4 jours après concentration à 7 cc.

3° Les effets de l'acide malique se montrent, pour des solutions contenant 40 méq. d'acide tartrique et 50 ou 100 méq. d'acide malique par litre,

a) inférieurs à 1 méq/l par la méthode « sans concentration, addition d'alcool » à condition de limiter l'addition d'alcool à 5 cc pour 20 cc de prise ;

b) inférieurs, suivant la concentration en acide malique, à 1,5 ou 2 méq/l, par la méthode « avec concentration, sans addition d'alcool » à condition de concentrer de 20 à 7 cc, mais non davantage.

L'erreur est, en fait, nettement plus faible à cause de la petite quantité de bitartrate de K qui reste en solution.

On pourrait croire que la comparaison, que nous venons de faire pour aboutir aux conclusions ci-dessus, entre les résultats du dosage d'une solution témoin ne contenant que du bitartrate de K et des solutions contenant aussi de l'acide malique, permet de bien dégager l'influence de ce dernier.

En réalité, nous avons constaté ultérieurement que l'acide malique diminuait légèrement la vitesse de cristallisation du bitartrate de K ; l'influence de cet acide se trouve ainsi, en partie masquée de ce fait ; c'est d'ailleurs ce qui permet de comprendre — comme le montrent les résultats, mais dans des limites voisines des erreurs d'expérience — pourquoi il est préférable de ne pas faire durer la cristallisation à 2°C plus de 4 jours.

6e *ESSAI. — Double cristallisation.*

Nous avons essayé de réduire ou d'annuler l'influence de l'acide malique en purifiant les cristaux par solubilisation et réalisation d'une deuxième cristallisation.

Une partie d'une solution saturée de bitartrate de K à 26,87 méq/l a été additionnée de 80 méq. d'acide malique par litre. Ces solutions ont été analysées dans les conditions indiquées sur le tableau XVIII, par simple et par double cristallisation.

Conclusions

1° A 16°3 d'alcool, pH 3,8, tous les résultats sont déficients. (sauf celui donné par simple cristallisation en présence d'acide malique, qui est excédentaire).

La perte de bitartrate de K apparaît être 0,56 par cristallisation ; elle double : 1,12 du fait de la double cristallisation pour laquelle le facteur acide malique ne paraît plus influer.

2° A 20 et 25° d'alcool, pH 4 ; les résultats sont exacts à 0,25 et 0,5 méq. près environ, sauf par simple cristallisation en présence d'acide malique : le résultat est alors trop élevé.

La double cristallisation supprime donc l'influence de l'acide malique et permet, dans ces conditions, d'obtenir en 8 jours (4 jours par cristallisation) des résultats exacts à 0,5 méq. près.

A 25°, on constate une légère influence de l'acide malique ; la condition 20° d'alcool est donc à préférer.

3° A 30° d'alcool, l'influence de l'acide malique se montre accrue.

Ces résultats permettent-ils de mettre, dans une certaine mesure en évidence, l'influence de l'acide malique ?

Dans ces conditions de dosage et de composition des solutions $\frac{\text{Acide tartrique}}{\text{Acide malique}} = \frac{25}{40}$, les résultats ne mettent pas en évidence des pertes en acide tartrique retenu en solution du fait de l'acide malique.

Quant aux quantités d'acide malique entraînées par le bitartrate de K, elles croissent dans l'ensemble avec le degré alcoolique.

***

Dans ces mêmes conditions, le tampon acétique pH 4 donne des résultats aussi intéressants :

Résultats : Consulter le tableau XIX relatif :

1° A une solution de bitartrate de K à 27 méq/l.

2° A une solution contenant en plus de l'acide malique : 80 méq/l.

TABLEAU XIX

Tampon acét. pH 4 + 20 % d'alcool	Une seule cristallisation			Double cristallisation		
		Δ	Δ′		Δ	Δ′
Témoin T	27,12 ± 0,12	+ 0,12		26,75 ± 0,25	— 0,25	
T + Ac. malique.....	30,37 ± 0,12	+ 3,37	+ 3,25	26,5 ± 0	— 0,5	— 0,25

La méthode de dosage : « Tampon pH 4 acétique ou formique, sans concentration ; 20° d'alcool, double cristallisation » quoique relativement longue, sera donc à envisager, pour éliminer l'influence perturbatrice de l'acide malique, dans le cas des liquides pour lesquels l'effet perturbateur de cet acide serait trop élevé. Ce n'est pas le cas des liquides simples précédemment étudiés.

3') *Étude des facteurs de perturbation de l'acide malique.*

Essayons de dégager les facteurs susceptibles de modifier l'influence perturbatrice de l'acide malique.

S'il y a bien, suivant notre hypothèse, entraînement de molécules

de bimalate de K, ce seront les facteurs influant en solution, sur le rapport :

$$R_2 = \frac{\text{Concentration en mol. non dissociées de bimalate de K}}{\text{Concentration en mol. non dissociées de bitartrate de K}}$$

a) Plus le rapport :

$$R_1 = \frac{[\text{ions bimalates}]}{[\text{ions bitartrates}]}$$

est élevé dans la solution, plus R_2 sera grand.

Or, ce rapport dépend :

α) à un pH déterminé, de :

$$R = \frac{[\text{Acide malique total}]}{[\text{Acide tartrique total}]} \text{ dans la solution ;}$$

Plus R est grand, plus R_1 et R_2 sont élevés.

Nous avons constaté que l'influence de ce rapport sur les résultats des dosages de bitartrate de K ne leur est pas proportionnelle du fait des effets contraires : retard de cristallisation dû à l'acide malique et entraînement de bimalate de K dans les cristaux ; c'est d'ailleurs ce qui a maintenu longtemps incompréhensible l'ensemble des résultats expérimentaux ;

β) pour un rapport $R = \frac{[\text{acide malique total}]}{[\text{acide tartrique total}]}$

déterminé, R_1 dépend du pH ; celui-ci influe sur la proportion de chacun de ces acides totaux qui se trouve sous forme d'ions bimalates ou bitartrates.

D'après les courbes de variation en fonction du pH, d'une part du nombre d'ions bitartrates pour cent molécules d'acide tartrique total, d'autre part d'ions bimalates pour cent molécules d'acide malique total Tableaux I et XIX bis Fig. I alors que les proportions d'ions bitar-

TABLEAU XIX *bis*

Proportions d'acide malique (1) *en p.* 100 *mol. totales à l'état de molécules et sous forme d'ions bimalates et d'ions malates.*

Formule employée : $\log \frac{[A^-]}{[AH]} = pH - pK$

pH	2,7	3,0	3,46	3,53	4,0	4,25	4,5	5,05
Acide malique non dissocié...	85,14	74,09	49,37	45,26	20,94	12,14	6,65	1,26
Ions bimalates	14,80	25,68	49,36	53,16	72,59	75,72	72,88	49,37
Ions malates ..	0,06	0,23	1,27	1,58	6,47	12,14	20,52	49,37

(1) Les pK des 2 fonctions de l'acide malique étant 3,46 et 5,05 d'après JAULMES (1). (KOLTHOFF et STENGER indiquent 3,40 et 5,05 à 25°).

trates (1) n'augmentent presque plus au-dessus de pH 3,4 et baissent au-dessus de pH 3,55, celles d'ions bimalates croissent en solution aqueuse jusqu'à pH 4,2, puis décroissent, mais, jusque vers pH 4,5, bien moins que les proportions d'ions bitartrates. (Voir courbes T_1 et M de la Fig. 1.)

On peut donc s'attendre à un entraînement accru du bimalate de pH 3,6 à pH 4,5.

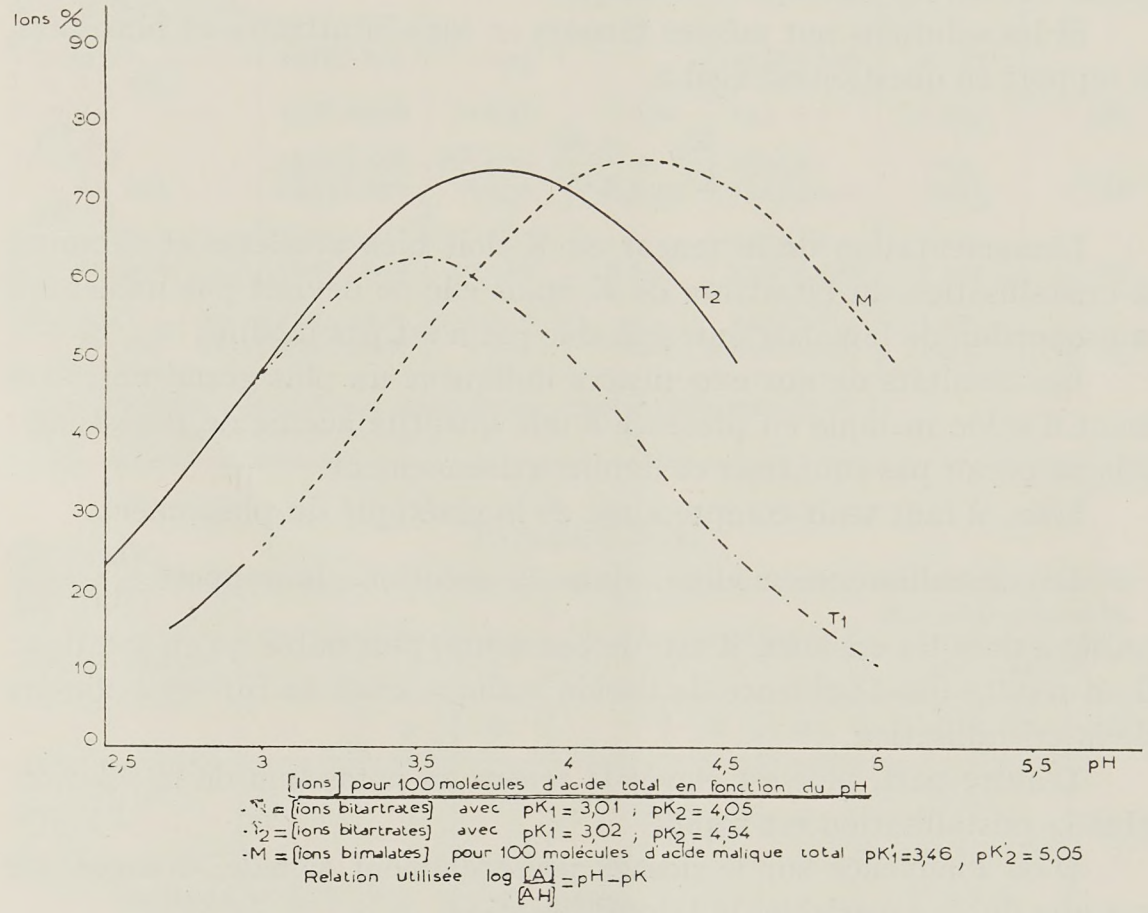
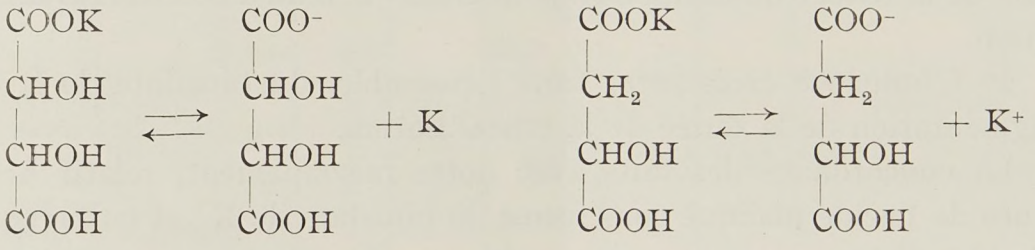


FIG. 1.

En présence d'alcool, il convient de décaler légèrement ces pH vers le haut.

b) Plus la concentration en potassium est élevée, plus il y a de bitartrate et de bimalate qui précipitent



$$\frac{[bit^-]\,[K^+]}{[bit.\ K]} = K_1 \qquad \frac{[bim^-)\,(K^+]}{[bim.\ K]} = K'_1 \qquad \frac{[bim.\ K]}{[bit.\ K]} = \frac{K_1}{K'_1} \times \frac{[bim^-]}{[bit^-]}$$

(1) En tenant compte de $pK_2 = 4{,}05$ qui nous a paru le plus exact. Avec $pK_2 = 4{,}54$: même constatation, mais au-dessus de pH 3,6-3,8 environ.

Le rapport $\frac{(\text{bim. K})}{(\text{bit. K})}$ est, dans la solution,

α) indépendant de la concentration en Potassium ;

β) proportionnel :

au rapport de concentration des ions bimalates et bitartrates,

au rapport des constantes de dissociation des premières fonctions acides des acides tartrique et malique.

Si les solutions ont mêmes teneurs en ions bitartrates et bimalates, le rapport en question est égal à :

$$\frac{K_1}{K'_1} = \frac{3,02}{4,06} = 0,88$$

L'augmentation de la teneur en K doit bien accélérer et accroître la cristallisation du bitartrate de K, mais elle ne devrait pas influer sur la proportion de bimalate entraîné si le pH n'est pas modifié.

Les résultats de nos expériences indiquent un plus grand entraînement d'acide malique en présence d'une quantité accrue de potassium ; cela ne paraît pas confirmer ce dernier raisonnement.

Mais, il faut tenir compte aussi de la cinétique du phénomène.

La cristallisation modifie, dans la solution, le rapport $\frac{(\text{bim. K})}{(\text{bit. K})}$ puisque dans les cristaux, il est, de beaucoup, plus faible qu'en solution ; il en résulte que l'influence de l'acide malique croît au fur et à mesure de la cristallisation.

D'autre part, plus est élevée la teneur en potassium de la solution, plus la cristallisation est rapide.

D'où l'influence sur le dosage précédemment signalé, dosage basé sur une durée invariable de la cristallisation.

Les tableaux suivants, XX, XXI et XXII, s'ils présentent de rares résultats paraissant légèrement aberrants, montrent nettement, néanmoins, en considérant les colonnes Δ' (influence de l'acide malique) :

1° L'influence croissante de l'acide malique avec le pH dès les limites indiquées (dès le pH 3,5) ; influe, il est vrai aussi, l'augmentation de la teneur du tampon en potassium qui tend à accélérer la cristallisation.

2° L'influence croissante, dans l'ensemble, du bimalate de K avec l'augmentation de la durée de la cristallisation.

La concordance des faits avec notre raisonnement, relatif à l'influence de l'acide malique sous forme de bimalate de K est en faveur de cette hypothèse.

3° L'influence de l'acide malique sur le résultat du dosage apparaît presque nulle à pH 3,3 et 3,4 pour 4 jours de cristallisation ; on peut simplement conclure qu'elle est suffisamment faible pour compenser approxi-

Tableau XX

Tampon formique Méthode par concentration	Une seule cristallisation					
	Durée : 4 jours			Durée : 6 jours		
	23,25	Δ	Δ′		Δ	Δ′
Analyse titri. directe pH 3,3 :						
Témoin T.....	23,18±0,07	+0,07		23,68±0,06	+0,43	
T + Ac. mal. 80 méq/l	23,56±0,06	+0,31	+0,24	25,5 ±0	+2,25	+1,82
pH 3,4 :						
Témoin T.....	23,06±0,06	—0,19		23,75±0	+0,5	
T + Ac. mal.....	24,43±0,07	+0,18	+0,37	25,43±0,43	+2,18	+1,68
pH 3,5						
Témoin T.....	23,25±0	0		23,75±0	+0,5	
T + Ac. mal.....	24,81±0,19	+1,56	+1,56	26,5 ±0,25	+3,25	+2,75
pH 3,8						
Témoin T.....	23,43±0,07	+0,18		24,25±0	+1,0	
T + Ac. mal.....	25,43±0,06	+2,18	+2,0	26,62±0,37	+3,37	+2,37

Δ = différence avec le dosage acidimétrique direct du bitartrate de K.
Δ′ = influence de l'acide malique.

Tableau XXI

Tampon acétique + 20 % d'alcool	Une seule cristallisation			Double cristallisation			Simple concentration Tampon acétique (pas d'alcool)		
		Δ	Δ′		Δ	Δ′		Δ	Δ′
pH 3,8									
Témoin T.....	37 ± 0	0		26	— 1		26,62 ± 0,12	— 0,38	
T + Ac. mal. 80 méq/l	30 ± 0	+ 3	+ 3	26,06 ± 0,31	— 0,94	+ 0,06	28,5 ± 0,5	+ 1,5	+ 1,88
pH 4,0									
Témoin T.....	27,12 ± 0,12	+ 0,12		26,75 ± 0,25	— 0,25		26,37 ± 0,12	— 0,63	
T + Acide mal...	30,37 ± 0,12	+ 3,37	+ 3,25	26,5 ± 0	— 0,5	— 0,25	28,93 ± 0,06	+ 1,93	+ 2,56
pH 4,2									
Témoin T.....	26,87 ± 0,12	— 0,13		26,37 ± 0,37	— 0,63		25,62 ± 0,12	— 1,38	
T + Acide mal...	30,5 ± 0	+ 3,5	+ 3,63	26,87 ± 0,13	— 0,13	+ 0,5	28,06 ± 0,06	+ 1,06	+ 2,44
pH 4,5									
Témoin T.....	26,93 ± 0,06	— 0,07		26,37 ± 0,12	— 0,63		26 ± 0	— 1	
T + Acide mal...	30,62 ± 0,06	+ 3,62	+ 3,69	27,12 ± 0,12	+ 0,12	+ 0,75	28,62 ± 0,37	+ 1,62	+ 2,62

mativement, dans ces conditions le retard de cristallisation qu'elle provoque. Elle croît les jours suivants.

TABLEAU XXII

Tampon acétique procédé par concentration	Durée de cristalisation		
	4 jours		
	25,62 méq/l de bit. K.	Δ	Δ′
Dosage titrim. direct :			
pH 2,7 :			
Témoin T	22,93 ± 0,19	—2,69	
T + Ac. mal. (80 méq/l)	20,37 ± 0,13	—5,25	—2,56
pH 3,01 :			
Témoin T	23,69 ± 0,19	—1,93	
T + Ac. mal	23,56 ± 0,06	—2,06	—0,13
pH 3,3 :			
Témoin T	25,12 ± 0,13	—0,50	
T + Ac. mal	25,56 ± 0,19	—0,06	—0,44
pH 3,4 :			
Témoin T	24,87 ± 0	—0,75	
T + Ac. mal	26,75 ± 0	+1,13	+1,88
pH 3,51 :			
Témoin T	24,87 ± 0	—0,75	
T + Ac. mal	26,6 ± 1,1	+1	+1,75
pH 3,81 :			
Témoin T	25,56 ± 0,06	—0,06	
T + Ac. malique	28,12 ± 0	+2,5	+2,56

Pour la durée de 4 jours que nous adoptons, il semble donc que nous devrions utiliser un tampon de pH 3,3 à 3,4.

TABLEAU XXIII

Tampon acétique Méthode par concentration	Degré alcoolique du mélange cristallisant							
	0°		16°3		20°		25°	
	Δ	Δ′	Δ	Δ′	Δ	Δ′	Δ	Δ′
pH 3,8								
Témoin T	— 0,38		— 0,32		0		+ 0,5	
T + Ac. mal (80 méq/l)	+ 1,5	+ 1,88	+ 2,36	+ 2,68	+ 3,0	+ 3,0	+ 4	+ 3,5
pH 4,0								
Témoin T	— 0,63		+ 0,25		+ 0,12		+ 0,12	
T + Ac. mal	+ 1,93	+ 2,56	+ 3	+ 2,75	+ 3,37	+ 3,25	+ 3,5	+ 3,37
pH 4,2								
Témoin T	— 1,4		— 0,25		— 0,13		+ 0,25	
T + Ac. malique	+ 1,06	+ 2,46	+ 2,87	+ 3,12	3,5	+ 3,63	4,37	+ 4,12
pH 4,5								
Témoin T	— 1		— 0,25		— 0,07		0	
T + Ac. mal	+ 1,62	+ 2,62	+ 2,75	+ 3,00	+ 3,62	+ 3,69	+ 3,5	+ 3,5

Mais, dans les moûts et les vins, d'autres corps, ajoutant leurs effets, tendent davantage à retarder la cristallisation qu'à accroître l'acidité des cristaux, de telle sorte qu'en définitive le pH à choisir, pour des dosages effectués après 4 jours de cristallisation à + 2°C doit être un peu

plus élevé. C'est ce que montrent les résultats obtenus avec ces liquides pour le dosage desquels nous avons utilisé avec succès le pH 3,5.

c) Enfin, le tableau XXIII montre que la proportion de bimalate entraîné croît avec la concentration en alcool, ce que nous avions déjà été conduits à constater dans le cadre d'essais plus limités à cet égard.

Hypothèse tendant à expliquer l'influence de l'acide malique.

Les faits précédemment constatés :

1° Retard de cristallisation du bitartrate de K sous l'action de l'acide malique, que des expériences complémentaires non exposées dans ce travail ont confirmé.

2° Entraînement d'acide malique par les cristaux.

[Montrent l'existence de phénomènes d'interaction entre les molécules de bitartrate et d'acide] malique ou de bimalate (attraction et orientation mutuelle).

De plus, si l'on remarque que :

1° La proportion d'acide malique entraîné est beaucoup plus faible que sa proportion en solution relativement à l'acide tartrique.

2° Cette proportion est sans relation possible avec les solubilités respectives des sels acides correspondants étant donné que le bimalate de K est loin d'être en solution saturée.

3° pH et concentration en potassium exercent cependant leur effet comme si le bimalate de K était en solution sursaturée.

On constate que tout se passe comme s'il existait une liaison entre une partie des molécules de bimalate et de bitartrate (et entre leurs ions d'autre part), donnant un sel de K, acide, de solubilité limitée et en équilibre avec les ions résultant de sa dissociation.

Si la formation d'esters entre ces deux corps n'était pas une explication suffisante, on pourrait se poser la question de l'influence à cet égard de liaisons hydrogène entre les fonctions alcools de ces acides alcools et de leurs sels. Il est cependant possible qu'il y ait simple phénomène physique d'orientation mutuelle et d'attraction entre molécules.

γ') Cas de Solutions diluées de bitartrate de K.

Nous avons considéré jusqu'à maintenant, des solutions de bitartrate de K saturées à la température ordinaire, mais il est possible que les moûts soient parfois des solutions plus ou moins loin de la saturation en bitartrate de K.

Dans le cas des vins, si l'on admet qu'ils sont normalement saturés en ce sel acide, le fait d'éliminer l'alcool en concentrant la prise d'essai, provoque une modification à cet égard ; d'autre part, les vins dont l'acide tartrique a été attaqué par des bactéries peuvent être loin de la saturation.

Il est donc utile d'étudier l'influence sur le dosage, de la teneur du liquide primitif en bitartrate de K.

On trouvera au tableau XXIV, les résultats de l'analyse d'une solution saturée de bitartrate de K (29,37 méq/l), elle-même diluée aux 2/3 (19,75 méq/l) puis au tiers (9,5 méq/l) et au Tableau XXV les résultats relatifs à une autre solution de concentration légèrement différente et, comme la précédente, plus ou moins diluée, mais en présence ou non d'acide malique.

TABLEAU XXIV

Influence de la concentration en bitartrate de K.

	Bitartrate de potassium					
	29,37 méq/l		19,75 méq/l		9,5 méq/l	
		Δ		Δ		Δ
Méthodes sans concentration :						
pH :						
Tampon acétique	29 ± 0,25	— 0,37	19,25 ± 0	— 0,5	8,25 ± 0,25	— 1,25
Tampon formique	29,5 ± 0,13	+ 0,13	19,68 ± 0,18	— 0,07	9 ± 0	— 0,5
Méthodes avec concentration :						
pH 3,5 :						
Tampon acétique	28,93 ± 0,06	— 0,44	19,25 ± 0	— 0,5	9,12 ± 0,12	— 0,38
Tampon acétique à 10° alcooliques	29,12 ± 0,25	— 0,25	19,5 ± 0,25	— 0,25	9,18 ± 0,31	— 0,32
pH 3,5 :						
Tampon citrique	29,5 ± 0,5	+ 0,53	19,12 ± 0,12	— 0,63	7,06 ± 0,06	— 2,44
Idem à 10° alcooliques	29,06 ± 0,6	— 0,31	19,43 ± 0,06	— 0,32	7,73 ± 0,06	— 1,27
pH 3,5 :						
Tampon formique	28,87 ± 0,12	— 0,5	19 ± 0	— 0,75	9,06 ± 0,06	— 0,44
Idem à 10° alcooliques	29,18 ± 0,06	— 0,19	19,25 ± 0	— 0,50	9,43 ± 0,06	— 0,07

Constatations relatives aux tableaux XXIV et XXV.

Toutes les méthodes essayées donnent de bons résultats pour les concentrations de 29 et 19 méq/l, solutions saturées et aux 2/3 saturées.

Dans le cas des solutions au tiers de la saturation :

— Donnent de bons résultats, les méthodes par concentration avec tampon acétique ou formique ;

— Donnent des résultats déficients :

— la méthode « sans concentration, tampon acétique » (il faudrait vraisemblablement laisser cristalliser plus longtemps ; mais nous avons vu qu'en limitant à 4 jours la cristallisation, tout se passe comme si nous limitions l'influence de l'acide malique ; il ne serait guère pratique de modifier cette durée suivant la teneur en acide tartrique qui est justement à déterminer) ;

— et surtout la méthode par « concentration ; tampon citrique ».

L'addition de 10 p. 100 d'alcool après concentration remédie partiellement à cet inconvénient.

TABLEAU XXV. — *Influence de la concentration d'acide tartrique en présence d'acide malique.*

BITARTRATE DE K.

	20 méq/l						10 méq/l						5 méq/l					
	Pas d'ac. malique			80 méq. ac. malique			Pas d'ac. malique			80 méq. ac. malique			Pas d'ac. malique			80 méq. acide malique		
	Calculé	Dosé	Δ	Dosé	Δ	Inf. ac. mal.	Calculé	Dosé	Δ	Dosé	Δ	Inf. ac. mal.	Calculé	Dosé	Δ	Dosé	Δ	Inf. ac. mal.
Méthode sans concentration																		
Mode opératoire habituel (tampon acétique 3,8 ; concentration)	20,00	19,5 ± 0	— 0,5	21,5	+ 1,5	+ 2	10,06	9,18 ± 0,06	— 0,86	9,31 ± 0,19	— 0,75	+ 0,13	5,03	4,06 ± 0,06	— 0,97	3,0	— 2,03	— 1,06
Prise doublée	20,00	19,84 ± 0,09	— 0,16	24,37 ± 0,12	+ 4,37	+ 4,53	10,06	9,71 ± 0,09	— 0,35	10,56 ± 0,06	+ 0,5	+ 0,84	5,03	4,68 ± 0,06	— 0,35	5,03 ± 0,16	0	+ 0,44
Addition 10cc sol. sat. bit. K	20,00	19,81 ± 0,44	— 0,19	23,12 ± 0,12	+ 3,12	+ 3,31	10,06	9,31 ± 0,06	— 0,75	11 ± 0	+ 0,94	+ 1,68	5,03	4,62 ± 0,12	— 0,41	6,25 ± 0,37	+ 1,22	+ 1,62
T. (pH 3,8) doublé	20,00	19,5 ± 0	— 0,5	21,87 ± 0	+ 1,87	+ 2,37	10,06	9,62 ± 0,06	— 0,44	10 ± 0,25	— 0,06	+ 0,37	5,03	3,68 ± 0,18	— 1,35	3,62 ± 0,12	— 1,41	— 0,06
Méthode avec concentration																		
Mode opératoire habituel (tampon acétique 3,5 ; concentration)	20,12	19,69 ± 0,06	— 0,43	21,62 ± 0,12	+ 1,5	+ 1,93	10,06	9,5	— 0,5	9,31 ± 0,06	— 0,75	+ 0,56	4,94	4,87 ± 0,12	— 0,07	3,68 ± 0,31	— 1,26	— 1,19
10° alcooliques	19,97	19,87 ± 0	— 0,10	25,37	+ 5,4	+ 5,5	10,06	10	— 0,06	11,5 ± 0	+ 1,44	+ 1,5	5,03	4,62 ± 0,12	— 0,41	4,43 ± 0,18	— 0,60	— 0,18
16°3 alcooliques	20,12	20,50 ± 0,12	+ 0,38	23,75 ± 0	+ 3,63	3,25	10,06	10 ± 0	— 0,06	11,62	+ 1,56	+ 1,62	4,94	5,06 ± 0,06	+ 0,12	6 ± 0	+ 1,06	+ 0,94
Prise doublée	20,12	19,9 ± 0,03	— 0,22	23,44 ± 0,07	+ 3,32	+ 3,35	10,06	9,78 ± 0,03	— 0,26	11,68 ± 0,05	+ 1,62	+ 1,90	4,94	4,78 ± 0,03	— 0,16	5,68 ± 0	+ 0,74	+ 0,90
Addition 10cc sol. sat bit. K	20,12	19,74 ± 0,12	— 0,38	22,37	+ 2,25	+ 2,62	10,06	9,31 ± 0,06	— 0,75	11,68 ± 0,06	+ 1,62	2,37	4,94	4,87 ± 0,12	— 0,07	7 ± 0,25	+ 2,06	+ 2,12
Tampon pH 3,5 doublé	20,12	20,93 ± 0,06	+ 0,81	22,5 ± 0	+ 2,38	+ 1,56	10,06	10,18 ± 0,06	+ 0,12	11	+ 0,94	+ 0,81	4,94	5,37 ± 0,12	+ 0,43	5	+ 0,06	— 0,37

Le fait de ramener, après concentration, les solutions à 10 degrés d'alcool, apparaît avantageux et ceci, surtout, dans le cas du tampon citrique qui s'est montré particulièrement déficient.

En présence de 10 degrés d'alcool, il aurait été théoriquement préférable d'employer un tampon de pH 3,6.

La méthode avec concentration reste préférable à l'autre ; si les modifications essayées au cours de l'expérience XXV n'apparaissent pas à conseiller, on constate que, même en présence d'acide malique (XXV), l'erreur absolue reste relativement faible.

Cette expérience montre en outre que lorsqu'il y a très peu d'acide tartrique par rapport à l'acide malique, le phénomène « retard de la cristallisation du bitartrate de K » a sur le résultat de l'analyse, plus d'effet que le phénomène « entraînement de bimalate par le bitartrate de K ».

Ces deux phénomènes se compenseraient, dans les conditions de réalisation de nos méthodes de dosage, lorsque le rapport $\frac{\text{ac. tartrique total}}{\text{ac. malique total}}$ est de l'ordre de 1/3 à 1/8.

Cependant, ces limites pouvant aussi varier avec la teneur de la solution en substances solubles, nous nous garderons de les généraliser.

Pour $\frac{\text{acide tartrique total}}{\text{acide malique total}} = \frac{1}{2}$ l'influence de l'entraînement du bimalate est, dans le tableau XXV, dominant.

Comment diminuer les erreurs
dans le cas de solutions pauvres en acide tartrique ?

Il était intéressant d'essayer de diminuer les inconvénients d'une faible concentration en bitartrate de K.

Dans ce but, nous avons essayé les procédés suivants :

1° Une fois la prise concentrée, la ramener au degré alcoolique moyen des vins (10°) ou au degré réalisé par la méthode sans concentration (16°3).

2° Doubler la prise d'essai.

3° Ajouter une quantité connue de bitartrate de K (nous nous étions demandé si cela ne faciliterait pas la cristallisation, mais cela devait logiquement augmenter la quantité d'acide malique entraîné.)

4° Doubler le volume de solution tampon.

Les résultats du tableau XXV, correspondant à des analyses faites avec des tampons acétiques de pH 3,5 et 3,8, suivant le degré alcoolique du mélange en voie de cristallisation, montrent que ces différentes modifications aux techniques précédemment mises au point sont défavorables parce qu'elles accroissent l'influence perturbatrice de l'acide malique.

En conclusion, aucune des modifications essayées ne donne satisfaction.

Restent utilisables, avec une précision intéressante, les méthodes par concentration avec tampon acétique ou formique.

γ) Étude de l'Influence d'anions autres que ceux de l'acide malique

Nous avons travaillé précédemment à éliminer l'influence perturbatrice des ions de l'acide malique.

Etudions maintenant celle d'autres anions :

1° Ceux de l'acide lactique pour le cas où il en serait entraîné par les cristaux de bitartrate de K.

2° Ceux de l'acide phosphorique dont la précipitation sous la forme de phosphate biacide accroîtrait le résultat du dosage ; le pK de la deuxième fonction acide de l'acide phosphorique étant 6,7, on voit qu'à pH 3,5 cette fonction est en effet presque entièrement libre. Au virage de la phénolphtaléine, elle serait dosée.

3° Ceux de l'acide sulfurique, quoique l'on ne puisse guère prévoir à pH 3,5 que la précipitation du sulfate neutre qui ne perturberait pas le résultat analytique ; mais il pourrait y avoir adsorption d'ions SO_4^{--}.

Influence de l'acide lactique.

Composition de la solution : Bitartrate de K., 28,25 méq/l, Acide lactique, 20,4 méq/l.

Durée de cristallisation : 4 jours.

Résultats : Consulter le tableau XXVI.

Tableau XXVI

	Bit. K en méq/l	Δ	Influence de l'Ac. lactique
Méthode sans concentration mais avec alcool :			
Tampon acétique			
Témoin T	27,75 ± 0	— 0,5	
T + Ac. lactique	27,62 ± 0	— 0,63	— 0,13
Tampon formique			
Témoin T	28,37 ± 0	+ 0,12	
T + Ac. lactique	28,37 ± 0,13	+ 0,12	0
Méthode avec concentration :			
Tampon acétique			
Témoin T	27,81 ± 0,06	— 0,44	
T + Ac. lactique	28,12 ± 0,13	— 0,13	+ 0,31
Tampon citrique			
Témoin	27,5	— 0,75	
T + Ac. lactique	27,93 ± 0,07	— 0,32	+ 0,43
Tampon formique			
Témoin T	27,93 ± 0,06	— 0,32	
T + Ac. lactique	28,67 ± 0,13	— 0,42	+ 0,74

L'acide lactique paraît être entraîné en petites quantités dans le cas de la méthode par concentration, mais son effet défavorable sur le

dosage reste dans la limite de 0,8 méq/l quoique la teneur de la solution en acide lactique soit assez élevée par comparaison avec la moyenne des vins.

Influence des ions PO_4^{---} *et* SO_4^{--}.

Nous avons d'abord étudié l'influence de ces anions en présence d'acide tartrique et de potasse seuls, pour tenir compte de la précipitation possible des sels de potassium correspondants ; nous analyserons plus loin des solutions contenant aussi des cations calcium.

1re Expérience

Solution préparée :

Solution aqueuse de bitartrate de K à 25,5 méq/l, additionnée, en deux portions différentes,

l'une S, de 2 g de SO_4K_2/l, soit 22,9 méq d'SO_4H_2 par litre ;

l'autre P, de 0,5 g de PO_4H_2 K/l, soit 11 méq de PO_4H_3 par litre ; c'est la teneur en acide phosphorique d'un vin de lies (Hugues) ; de tels liquides en sont particulièrement riches.

Le dosage de l'acide tartrique a été fait comme précédemment sur des prises de 20 cc de ces solutions, par les méthodes :

« Addition d'alcool, pas de concentration à 7 cc »

« Pas d'addition d'alcool, mais concentration ».

Résultats : Consulter le tableau XXVII.

Conclusions : Après 4 jours de cristallisation, le résultat du dosage par concentration correspond bien à la quantité d'acide tartrique primitivement en solution, dans la limite ± 1 méq/l.

La méthode sans concentration a donné des résultats déficients par suite, vraisemblablement, de l'emploi d'un tampon de pH trop bas 3,5 alors que le pH 3,8 aurait été préférable dans ce cas, à cause de l'addition d'alcool.

2e Expérience

Cette fois, 2 sur 3 des solutions étudiées contenaient de l'acide malique.

Les solutions A, B et C :

A : Solution aqueuse de bitartrate de K à 20,5 méq/l ;

B : Solution A + 50 méq/l d'acide malique ;

C : Solution A + 100 méq/l d'acide malique.

ont été additionnées, par portions *a*, *b* de :

a) phosphate monopotassique crist. : 0,50 g/l, soit acide phosphorique : 11 méq/l ;

b) sulfate de potassium cristallisé : 1,9 g/l en SO_4K_2, soit acide sulfurique : 21 méq/l.

Tableau XXVII

		Méthode de dosage							
		Alcool : 2 jours ou 4 jours		Concentration : 4 jours			Alcool : 2 jours		Concentration : 4 jours	
		ac. tart. méq/l	Δ		Δ			Δ		Δ
Tampons										
acétique	Témoin sans PO_4H_2K	(2) 23,75	— 1,75			Témoins sans SO_4K_2	(2) 22	— 3,5		
	P	(2) 22,125	— 3,38	25	— 0,5	T + SO_4K_2	(2) 23	— 2,5	25,25	— 0,25
		(4) 25,5	0		— 0,5		(4) 25,25	— 0,25	25,25	— 0,25
citrique	Témoin sans PO_4H_2K			25,25	0	Témoin sans SO_4K_2			25,5	0
	P			25,25	0	T + SO_4K_2			25,25	— 0,25
				25,25	0				25,25	— 0,25
formique	Témoin					Témoin				
	P			25,75	+ 0,25	T + SO_4K_2			25,75	+ 0,25
				25,5	+ 0				25,75	+ 0,25

(2) et (4) veulent dire : durée de cristallisation : 2 ou 4 jours.

Chacune de ces solutions a été dosée en présence, respectivement, des tampons acétique, citrique et formique.

1° Par la méthode « sans concentration, addition d'alcool »

2° Par la méthode qui comporte la concentration du liquide primitif jusqu'à 7 cc de solution résiduelle.

Résultats : Consulter le tableau XXVIII.

Conclusions : Les résultats obtenus sont exacts à moins du méq. près, sauf dans le cas du tampon formique en présence de sulfate ; ils sont alors parfois (méthode sans concentration) très légèrement plus élevés, mais dans la limite de 1,5 méq/l. Cela s'explique par la concentration plus élevée en ions K^+ qui accentue l'insolubilisation de l'acide tartrique et de l'acide malique et non par l'entraînement d'acide sulfurique qui, en l'absence d'acide malique ne donnait pas d'ennui.

L'analyse qualitative ne permet d'ailleurs pas de caractériser de sulfates dans les cristaux.

Résultats :

TABLEAU XXVIII

	PO_4^{---}		SO_4^{--}	
Tampon acétique :				
Avec alcool	20,75 ± 0	+ 0,25	20,37 ± 0,13	— 0,13
Avec concentration	20,87 ± 0,13	+ 0,35	20,37 ± 0,13	— 0,13
Tampon citrique :				
Avec alcool	20,37 ± 0,13	— 0,12	21 ± 0	+ 0,5
Avec concentration	20,75 ± 0,25	+ 0,25	21 ± 0,25	+ 0,5
Tampon formique :				
Avec alcool	21,25 ± 0	+ 0,75	21,87 ± 0,13	+ 1,37
Avec concentration	21 ± 0	+ 0,5	20,75 ± 0,25	+ 0,25
Sol. B :				
Tampon acétique :				
α avec alcool	21,13 ± 0,13	+ 0,63	20,87 ± 0,13	+ 0,37
β avec concentration ..	20,87 ± 0,13	+ 0,37	21 ± 0,25	+ 0,5
Tampon citrique :				
α avec alcool	21,13 ± 0,38	+ 0,63	21,25 ± 0	+ 0,75
β avec concentration...	21,13 ± 0,13	+ 0,63	21,13 ± 0,13	+ 0,63
Tampon formique :				
α avec alcool	21,38 ± 0,13	+ 0,88	21,63 ± 0,13	+ 1,13
β avec concentration ..				
Sol. C :				
Tampon acétique :				
α avec alcool	21,38 ± 0,13	+ 0,88	20,75 ± 0	+ 0,25
β avec concentration ..	21,13 ± 0,13	+ 0,63	21,13 ± 0,13	+ 0,63
Tampon citrique :				
α avec alcool	20,75 ± 0	+ 0,25	21 ± 0	+ 0,5
β avec concentration ..				
Tampon formique :				
α avec alcool.....	21,25 ± 0,25	+ 0,75	20,75	+ 0,25
β avec concentration ..	21,25 ± 0	+ 0,75	21	+ 0,5

3e EXPÉRIENCE

En faisant durer davantage la cristallisation, l'erreur s'accentue.

Témoin : solution aqueuse de bitartrate de K : 33,25 méq/l.

Solution G :

Bitartrate de K : 33, 25 méq/l.

Acide malique : 72 mmol/l.

Acide sulfurique : 23 mmol/l (ajouté sous forme de SO_4K_2).

Résultats : Consulter le tableau XXVIII.

L'erreur absolue par excès : 1,5 méq/l pour 4 jours de cristallisation, passe à + 3,4 pour 6 jours.

TABLEAU XXVIII *bis*

	Durée de cristallisation			
	4 jours		6 jours	
		Δ		Δ
Tampon citrique Concentration à 7cc				
Témoin	32,87 ± 0,12	—0,38	33,37 ± 0,12	+ 0,12
G	34,75 ± 0	+1,5	36,62 ± 0,12	+ 3,37

b) PRÉCIPITATION DE TARTRATES NEUTRES OU MAINTIEN EN SOLUTION D'ACIDE TARTRIQUE COMPLEXÉ

(Étude de l'influence de cations autres que les ions potassium.)

Certains cations pourraient exercer une influence défavorable sur le dosage,

— soit en précipitant sous la forme d'un tartrate neutre, tel que le tartrate de calcium ;

— soit parce qu'ils forment, avec l'acide tartrique, un complexe soluble, tel que les ferritartrates.

On peut aussi se poser la question de l'influence que pourrait avoir la présence en proportion relativement importante d'autres cations n'exerçant pas les effets précédents quoique les équilibres entre les ions étant constamment détruits au cours de la cristallisation du bitartrate de K dans le sens de la formation de nouvelles molécules non dissociées de ce sel acide, il semble, au premier abord, que l'effet de ces cations ne peut être que très faible en présence d'un excès d'ions K^+.

Influence de l'ion Calcium.

D'après notre expérimentation :

1° Des quantités de calcium de l'ordre de 8,5 méq/l (tableau XXIX), n'ont pas d'effet sur le dosage, que la solution contienne ou non des phosphates.

2° La présence de calcium en trop grande proportion (20 méq/l) (tableau XXX) empêche, mais seulement avec le tampon acétique,

le dosage intégral de l'acide tartrique dans le cas de solutions simples de celui-ci.

Une précipitation de tartrate de Ca a été mise en évidence dans ce cas.

L'erreur peut être relativement importante, la moitié presque du Ca précipitant : 20 méq de Ca/l, provoquent, dans le dosage du bitartrate de K une erreur de l'ordre de 5 méq/l en moins.

Dans le cas des tampons citrique et formique, le Ca reste en solution et ne perturbe pas ou très peu le dosage.

Tableau XXIX

Action des cations Ca^{++}, en présence ou non des anions PO_4^{---}.

Composition des solutions :
Acide tartrique en bitartrate de K : 28,25 méq/l.
Calcium : 8,5 méq/l.
Acide phosphorique : 18 méq/l.
Durée de la cristallisation : 4 jours.

	Bitartrate de K en méq/l	Δ
Tampon acétique + alcool sans concentration :		
Témoin	27,75 ± 0	— 0,5
+ Cl_2Ca	27,81 ± 0,06	— 0,44
+ Cl_2Ca + PO_4KH_2	27,5 ± 0	— 0,75
Tampon acétique : concentration :		
Témoin	27,81 ± 0,06	— 0,44
+ Cl_2Ca	27,25 ± 0	— 1
+ Cl_2Ca + PO_4KH_2	27,74 ± 0,12	— 0,51
Tampon citrique : concentration :		
Témoin	27,5	— 0,75
+ Cl_2Ca	28	— 0,25
+ Cl_2Ca + PO_4KH_2	28,37 ± 0,06	+ 0,12
Tampon formique + alcool : sans concentration :		
Témoin	28,37 ± 0	+ 0,12
+ Cl_2Ca	28,31 ± 0,06	+ 0,06
+ Cl_2Ca + PO_4KH_2	28,24 ± 0,12	— 0,01
Tampon formique, concentration :		
Témoin	27,93 ± 0,06	— 0,32
+ Cl_2Ca	28,0 ± 0,12	— 0,25
+ Cl_2Ca + PO_4KH_2	28,43 ± 0,18	+ 0,18

Les vins normaux contiennent (Jaulmes (1) P. 129), de 50 à 200 mg de calcium par litre, soit de 1 à 5 méq de calcium par litre ; c'est dire que ce cas n'intéresse que des vins anormaux : moûts surtout et vins de vendanges partiellement désacidifiées au carbonate de calcium ou limonées, ou platrées, mutés et vins conservés dans des récipients en ciment non affranchi, si tant est que le vin puisse atteindre dans ces conditions des teneurs en calcium aussi élevées, les marcs de dégorgement à la glace (de 480 à 1968 mg de Ca/l d'après Francot et Geoffroy (24)).

Lors de leurs essais de désacidification sur un vin eudémisé conte-

Tableau XXX

Influence du calcium.

	Durées de cristallisation					
	2 jours		4 jours		6 jours	
	Bit. de K méq/l	Δ	Bit. de K méq/l	Δ	Bit .de K méq/l	Δ
Sans concentration:						
Alcool + tampon acétique :						
Témoin sans Cl_2Ca	23,8 ± 0	— 1,4	24,6 ± 0	—0,6		
+ Cl_2Ca (22,5 meq. de Ca/l)	18,7 ± 0,7	— 6,5 ± 0,7	22,2 ± 0	—3		
+ Cl_2Ca + oxal. de K	23,3 ± 0,1	— 1,9 ± 0,1	25,05 ± 0,05	—0,15 ± 0,05		
+ Cl_2Ca + SO_4K_2 (× 5)	23,6 ± 0	— 1,6	24,7 ± 0,1	—0,5 ± 0,1		
+ Cl_2Ca + SO_4K_2 (× 10)	23,9 ± 0,1	— 1,3 ± 0,1	25,2 ± 0	0		
Concentration jusqu'à 7 cc:						
Tampon acétique :						
+ Cl_2Ca			19,7 ± 0,1	—5,5 ± 0,1	19,7 ± 0,1	— 5,5 ± 0,1
+ Cl_2Ca + oxal. de K			25,5 ± 0,1	+0,3 ± 0,1	25,2 ± 0,1	0
Tampon citrique :						
Témoin			24,7 ± 0,1	—0,5 ± 0,1	25,1 ± 0,1	— 0,1 ± 0,1
+ Cl_2Ca			22,5 ± 0,3	—1,7 ± 0,7	24,9 ± 0,1	— 0,3 ± 0,1
+ Cl_2Ca + oxal. de K			24,4 ± 0	—0,8		
+ Cl_2Ca + SO_4K_2 (× 5)			25,1 ± 0,1	—0,1 ± 0,1	25,1 ± 0,1	— 0,1 ± 0,1
+ Cl_2Ca + SO_4K_2 (× 10)			25,25 ± 0,05	+0,05 ± 0,05	25,1 ± 0,1	— 0,1 ± 0,1
Tampon formique :						
+ Cl_2Ca			23,6 ± 0,02	—1,6 ± 0,02	24,4 ± 0	— 0,8
+ Cl_2Ca + oxal. de K			24,8 ± 0	—0,4 ± 0	23,5 ± 0,1	0

nant primitivement 2,6 mg de calcium/l, FABRE et BREMOND (23) ont trouvé :

CO_3Ca	Calcium dans le vin	Date du dosage
100 à 600 g/l	de 532 à 1 175 mg/l	15 jours après le traitement
100 à 400 g/l	de 416 à 736 mg/l	45 jours après le traitement
100 à 300 g/l	de 332 à 458 mg/l	60 jours après le traitement

On peut d'ailleurs éliminer l'effet perturbateur du Ca, dans le cas du tampon acétique, par l'addition d'oxalate ou de sulfate de K en excès. C'est ce que montre l'expérience suivante (tableau XXX) réalisée avec une solution aqueuse de bitartrate de K contenant, par litre 25,2 méq de ce sel acide et additionnée de 22,5 méq de Ca sous forme de Cl_2Ca.

L'acide oxalique élimine le calcium sous forme d'oxalate de Ca insoluble qui rend légèrement plus difficile la solubilisation ultérieure du bitartrate de K.

Nous avions utilisé le sulfate de potassium avec l'idée de précipiter le calcium sous forme de sulfate et l'espoir que les doses naturelles d'acide sulfurique des moûts et des vins suffiraient dans ce but. Mais, dans les conditions réalisées pour le dosage, le sulfate de calcium ne précipite pas.

De plus, en présence de doses élevées de Ca, de l'ordre de 20 méq/l, pour empêcher la précipitation du tartrate de Ca, les quantités stoechiométriques de sulfate correspondant au calcium ne suffisent pas, alors que des quantités 5 et 10 fois plus élevées conviennent.

L'action du sulfate de K s'explique surtout par l'apport d'ions K qui provoquent une rétrogradation de la dissociation du bitartrate de K, et par suite, l'augmentation de la sursaturation de la solution en ce sel acide.

L'addition de sulfate de K provoque aussi une rétrogradation de la dissociation du sulfate de calcium, donc une diminution de la teneur en ions Ca^{++}, ce qui tend à accroître la dissociation du tartrate de calcium.

La déficience du tampon acétique en présence d'ions calcium peut s'expliquer en partie par son pouvoir tampon limité ; elle s'explique surtout par sa teneur en potassium plus faible que celle des autres tampons essayés.

On constate (voir tableau XXX), dans le cas du tampon citrique qui permet d'obtenir des résultats exacts sans addition d'oxalate ou de sulfate de K :

1° Un léger mais net retard de la cristallisation du bitartrate de K des solutions contenant du Ca par rapport au témoin.

2° Une suppression de ce retard, ou même une augmentation de la vitesse de cristallisation lorsqu'on ajoute un excès d'oxalate ou de sulfate de potassium.

L'obtention du résultat exact pour les témoins, au bout de 6 jours au lieu des 4 jours précédemment constatés provient vraisemblablement de la prise qui fut ici, pour permettre d'effectuer avec plus de précision le dosage du calcium, de 50 cc au lieu de 20 cc ; il conviendra donc de ne pas modifier l'importance des prises.

Influence des ions Magnésium et Fer.

Le tableau XXXI résume les résultats d'analyse d'une solution saturée de bitartrate de K contenant 33,37 méq de ce corps par litre et de cette même solution additionnée soit de 9,8 méq de Mg/l sous la forme de Cl_2 Mg $6H_2O$, soit de 20 ou de 40 mg de fer par litre.

TABLEAU XXXI

	Bitartrate de K en méq/l	Δ
Tampon acétique (3,8) + alcool:		
Témoin	33,37 ± 0	0
T + Magnésium	33,31 ± 0,06	— 0,06
T + Fer 20 mg/l	32,87 ± 0	— 0,5
T + Fer 40 mg/l	32,12 ± 0,12	— 1,25
Tampon acétique (3,5) + concentration:		
Témoin	33 ± 0,25	— 0,37
T + Magnésium	33,68 ± 0,07	+ 0,31
T + Fer 20 mg/l	33,18 ± 0,18	— 0,19
T + Fer 40 mg/l	32	— 1,37
Tampon citrique (3,5): concentration:		
Témoin	33,43 ± 0,06	+ 0,06
T + Magnésium	33,37 ± 0,12	0
T + Fer 20 mg/l	33,43 ± 0,07	+ 0,06
T + Fer 40 mg/l	33,56 ± 0,19	+ 0,19
Tampon formique (3,8): concentration:		
Témoin	33,87 ± 0	+ 0,5
T + Magnésium	33,87 ± 0,12	0
T + Fer 20 mg/l	33,5 ± 0	+ 0,13
T + Fer 40 mg/l	32,62 ± 0	— 0,65
Tampon formique (3,5): concentration:		
Témoin	33,75	0
T + Magnésium	33,62 ± 0,12	+ 0,25
T + Fer 20 mg/l	33,81 ± 0,06	+ 0,44
T + Fer 40 mg/l	33,5 ± 0,12	+ 0,13

On ne constate pas d'influence défavorable nette de l'ion Mg^{++} dans ces conditions.

L'influence du fer est faible mais nette, sauf avec le tampon citrique, l'acide citrique complexant ce métal.

Ce n'est cependant que dans le cas du tampon acétique que l'erreur qui en résulte dépasse légèrement le méq/l dans le cas de la dose anormalement élevée de 40 mg de fer par litre.

Le tampon citrique donne de moins bons résultats que les autres ; il paraît utile d'essayer simplement de compléter ces derniers par le premier dans le cas de liquides riches en fer.

L'expérience suivante tableau XXXII met en évidence l'intérêt de ce processus.

Fer : 30 mg/l ; concentration de 20 cm de solution de bitartrate de K à 7 cc ; tampons de pH 3,5 ; durée de cristallisation : 4 jours.

TABLEAU XXXII

	Bit. K en méq/l	Δ	Influence du fer
Tampon citrique seul (4 cc)			
20 cc bit. K	31,43 ± 0,19	— 0,32	
20 cc bit. K + Fe	31,62 ± 0,12	— 0,13	+ 0,2
Tampon acétique seul (4 cc)			
20 cc bft. K	31,37 ± 0,12	— 0,38	
20 cc bit. K + Fe	30,62 ± 0,12	— 1,13	— 0,75
Tampon acétique (3 cc) + citrique (1 cc)			
20 cc bit. K	31,37 ± 0,12	— 0,38	
20 cc bit. K + Fe	31,56 ± 0,06	— 0,19	+ 0,2

Influence de l'ion sodium.

Il était intéressant, quoique cela ne put se rapporter qu'à des moûts et des vins de composition anormale ou falsifiés, d'étudier l'influence de l'ion sodium.

Les vins contiennent en effet d'habitude très peu de sodium : 0,02 à 0,23 g par litre, mais cette teneur est plus élevée lorsqu'ils proviennent de vignobles établis en terrain riche en chlorure de sodium ; l'addition de sel marin peut aussi être faite légalement jusqu'à 1 g par litre (soit 17 méq/l de sodium) ; celle de carbonate de sodium, non autorisée, a des buts bien connus.

Des solutions aqueuses de bitartrate de K, contenant de l'acide malique à raison de 50 et 100 méq/l, ont été additionnées de 25 et 50 méq de soude par litre.

A. Solution aqueuse d'acide tartrique (témoin) : 30 méq/l exprimés en bit. k.

B. Témoin + acide malique 50 méq/l.

B'. Témoin + acide malique 50 méq/l + soude 25 méq/l.

C. Témoin + acide malique 100 méq/l.

C'. Témoin + acide malique 100 méq/l + soude 50 méq/l.

TABLEAU XXXIII

	Bit. K en méq/l				
	A	B	B′	C	C′
Tampon acétique concentration à 7cc	29,25	30,75	29,75	30,25	29,5
Tampon citrique concentration à 7cc	29,75 ± 0	30,1 ± 0,5	29,75 ± 0,25	30,3 ± 0,05	29,6 ± 0,1

Dans les conditions de dosage telles que nous les avons fixées, la présence d'ions Na^+ ne modifie pas le résultat, dans les limites d'un méq/l ; il tend néanmoins à les diminuer.

Par contre, si certaines conditions deviennent moins favorables à la cristallisation du bitartrate de K, on constate un retard plus grand, pour ce qui concerne ce phénomène, en présence qu'en l'absence d'ions sodium (tableau XXXIV).

TABLEAU XXXIV

	Bit. K en méq/l				
	A	B	B′	C	C′
Tampon acétique sans concentration, sans ajouter d'alcool					
2 jours	26,5	26,75	25	26	21,25
4 jours	27	28	26,75	26,25	23
8 jours	27,75	27,75	27,25	26,75	23,75
Tampon citrique sans concentration, sans ajouter d'alcool					
2 jours	23,62	23,55	18,5	19,05	11,5
4 jours	25,75	23,5	21,25	23,25	10,75
8 jours	25,5	24,25	21,25	23,75	15

2. Milieux complexes.

Que se passe-t-il maintenant si tous les corps précédemment étudiés se trouvent dans la solution contenant environ :

Bitartrate de K	30 méq/l
Glucose	200 mg/l
PO_4H_3 ajouté sous forme de PO_4KH_2	18 méq/l

avec, suivant les expériences, en plus :

SO_4H_2	7 à 8 méq/l ou 195 méq/l
Ca	7 à 8 méq/l ou 22 méq/l

La teneur choisie en bitartrate de K correspond à une solution aqueuse saturée vers 20-25°C ; celle d'acide phosphorique, les premières teneurs en SO_4H_2 et en Ca, aux doses maxima dans les limites normales, dans les moûts et les vins.

Les autres teneurs en sulfate et Ca sont anormalement élevées pour tenir compte de l'addition possible du sulfate de K qui, comme nous l'avons vu, neutralise l'influence perturbatrice de doses anormalement élevées de Calcium, dans le cas où l'on emploie un tampon acétique.

a) SOLUTIONS SANS ACIDE MALIQUE

α) *Concentration non exagérée en SO_4K_2 et calcium.*

Composition de la solution E'	Méq/l
Bitartrate de K	31,5 [1]
SO_4H_2 (ajouté sous forme de SO_4K_2)	7,18
PO_4H_3 (ajouté sous forme de PO_4KH_2)	18
Ca (ajouté sous forme de Cl_2Ca)	8,5
Glucose	200 g/l

[1] 30 dans le cas des échantillons qui ont été soumis à une « durée de cristallisation de 4 jours ».

Résultats : Voir le tableau XXXV.

Conclusions : La méthode « au tampon acétique de pH 3,5 + alcool » a donné des résultats trop faibles ; ils sont exacts avec des tampons de pH 3,8, ce que la théorie permettait de prévoir.

TABLEAU XXXV

	Bitartrate de K en méq/l					
	Durées de cristallisation					
	2 jours		4 jours		6 jours	
	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ
ans concentration, addition d'alcool						
Tampon acétique (pH 3,5) :						
Témoin	30,2 ± 0,5	— 1,3	31,25	— 0,25		
Sol. E'	17,75 ± 6,75	—13,75	28,9	— 2,6		
Tampon acétique (pH 3,8) :						
Témoin			31,5 ± 0	0		
Sol. E'			31,0 ± 0	— 0,5		
Tampon formique (pH 3,8) :						
Témoin			31,75 ± 0,06	— 0,16		
Sol. E'			31,3 ± 0,06	— 0,2		
Concentration jusqu'à 7 cc :						
Tampon acétique :						
Témoin			31,4 ± 0,1	— 0,1	30,75	— 0,75
Sol. E'			31,6 ± 0,1	+ 0,1	30,75 ± 0	— 0,75
Tampon citrique :						
Témoin			31,75 ± 0,25	+ 0,25	30,9 ± 0,1	— 0,6
Sol. E'			31,5 ± 0	0	31,0 ± 0	— 0,5
Tampon formique :						
Témoin			31,6 ± 0,4	+ 0,1	31,25	— 0,25
Sol. E'			32,1 ± 0,1	+ 0,6	31,1 ± 0,1	— 0,4

Les méthodes « au tampon ; concentration » ont donné des résultats exacts.

β) *Concentration anormalement élevée en sulfate de potassium et en calcium.*

Composition de la solution D'	Méq/l
Bitartrate de K	33,25
SO_4H_2 (ajouté sous forme de SO_4K_2)	195
PO_4H_3 (ajouté sous forme de PO_4KH_2)	11
Ca (ajouté sous forme de Cl_2Ca)	22,5
Glucose	200 g/l

Résultats : Consulter le tableau XXXVI.

Conclusion : en présence d'un excès de SO_4K_2, le calcium, en proportion anormalement élevée, n'a pas gêné le dosage.

TABLEAU XXXVI

	Bit. de K en méq/l			
	Durées de cristallisation			
	4 jours		6 jours	
	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ
Tampon citrique				
Concentration :				
Témoin	33,06 ± 0,6	— 0,19	33,37 ± 0,12	+ 0,12
Solution D'	32,93 ± 0,18	— 0,32	34 ± 0	+ 0,75

b) SOLUTIONS CONTENANT AUSSI DE L'ACIDE MALIQUE

a) *Concentration non exagérée en sulfate de K et en calcium.*

	Méq/l
	—
Acide tartrique exprimé en bitartrate de K	34,75
Acide malique	80,6
SO_4K_2	7,18
PO_4H_3 (ajouté sous forme de PO_4KH_2)	18
Ca (ajouté sous forme de Cl_2Ca)	8,5
Glucose	200 g/l

Durée de cristallisation : 4 jours.

Résultats : Consulter le tableau XXXVII.

TABLEAU XXXVII

	Durée de cristallisation : 4 j.	
	Bit. K. en méq/l	Δ
Sans concentration : addition d'alcool.		
Tampon acétique (3,8) + alcool		
Témoin	34,5 ± 0	— 0,25
Solution	36,06 ± 0,19	+ 1,31
Tampon formique (3,8) + alcool		
Témoin	34,81 ± 0,06	+ 0,06
Solution	36,5 ± 0,12	+ 1,25
Concentration jusqu'à 7 cc		
Tampon acétique (3,5) + concentration		
Témoin	34,37 ± 0,12	— 0,38
Solution	36,81 ± 0,31	+ 2,16
Tampon citrique (3,5) + concentration		
Témoin	34,5 ± 0	— 0,25
Solution	36,5 ± 0,12	+ 1,25
Tampon formique (3,5) + concentration		
Témoin	35,12 ± 0	0,37
Solution	38,43 ± 0,18	3,68

Comme dans les solutions simples, on constate une légère influence de l'acide malique, surtout dans le cas du tampon formique ; les résultats du dosage sont ici moins exacts.

β) *Concentration non exagérée en SO_4K_2 ; pas de calcium.*

Composition de la solution E	Méq/l
Bitartrate de K	31,5
Acide malique	80,6
SO_4H_2 (ajouté sous forme de SO_4K_2)	7,2
PO_4H_3 (ajouté sous forme de PO_4KH_2)	18
Glucose	200 g/l

Résultats : Consulter le tableau XXXVIII.
On peut faire la même remarque que précédemment.

TABLEAU XXXVIII

	Durées de cristallisation					
	2 jours		4 jours		6 jours	
	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ
Sans concentration, addition d'alcool						
Tampon acétique (pH 3,5) :						
Témoin	30,2 ± 0,05	— 1,25	30,25 ± 0	— 0,25		
Solution E	7,5 ± 3	—23	24,75 ± 0,5	— 6,75		
Tampon acétique (pH 3,8) :						
Témoin			31,50 ± 0	0		
Solution E			33,18 ± 1,07	+ 1,68		
Tampon formique (pH 3,8) :						
Témoin			32 ± 0,25	+ 0,5		
Solution E			33,75 ± 0,12	+ 2,25		
Concentrations jusque à 7 cc :						
Tampon acétique :						
Témoin			31,4 ± 0,1	— 0,1	30,75	— 0,75
Solution E			33,0	+ 1,5	31,85	+ 0,35
Tampon citrique :						
Témoin			31,75 ± 0,25	+ 0,25	30,9 ± 0,1	— 0,6
Solution E			33,4 ± 0,1	+ 1,9	32,6	+ 1,1
Tampon formique :						
Témoin			31,9 ± 0,4	+ 0,4	31,0 ± 0,25	— 0,5
Solution E			34 ± 0	+ 2,5	32,5 ± 0	+ 1

γ) *Concentration plus élevée en SO_4K_2 en présence de Ca.*

Composition de la Solution :	Méq/l
Bitartrate de K	34,75
Acide malique	80,6
SO_4H_2 (ajouté sous forme de SO_4K_2)	45,9
PO_4H_3	18
Ca	8,5
Glucose	200 g/l

Résultats : Voir le tableau XXXIX.

TABLEAU XXXIX

	Bit. K	Δ
Sans concentration ; addition d'alcool.		
Tampon acétique (3,8) ; + alcool.		
Témoin	34,5 ± 0	— 0,25
Solution	37,75 ± 0,12	+ 1,87
Tampon formique (3,8) ; + alcool.		
Témoin	34,81 ± 0,06	+ 0,06
Solution	37,67 ± 0,17	+ 2,92
Concentration jusqu'à 7 cc		
Tampon acétique (3,5) ; concentration		
Témoin	33,75 ± 0	— 1
Solution	37,25 ± 0	+ 2,5
Tampon citrique (3,5) ; concentration		
Témoin	34,12 ± 0	— 0,63
Solution	37,06 ± 0,19	+ 2,31
Tampon formique (3,5) ; concentration.		
Témoin	34,75	0
Solution	37,92 ± 0,3	+ 3,17

δ) *Concentration anormalement élevée en sulfate de K et en calcium.*

Composition de la solution :	Méq/l
Bitartrate de K	33,8
Acide malique	80,6
SO_4K_2	195,4
PO_4KH_2 exprimé en méq/l de PO_4H_3	11
Ca^{++}	22,5
Sucres	122 g

Les résultats se trouvent être anormalement élevés (tableau XXXX) comme si, en présence de ces excès de sulfate de potassium et de calcium, l'acide malique était particulièrement entraîné. Nous avons vu qu'en l'absence d'acide malique, ils n'avaient pas d'effet perturbateur.

L'influence accrue de l'acide malique s'explique par une rétrogradation plus grande de la dissociation du bimalate de K en présence de l'augmentation de la concentration de la solution en ions K^+ (consulter le chap. sur les facteurs d'action de l'acide malique).

TABLEAU XXXX

	Durées de cristallisation					
	2 jours		4 jours		6 jours	
	Bit. K	Δ	Bit. K	Δ	Bit. K.	Δ
Sans concentration ; addition d'alcool						
Tampon acétique + alcool	35 ± 1	+ 1,2	37,1 ± 0,3	+ 3,3		
Concentration jusqu'à 7 cc						
Tampon acétique			38,1 ± 0,3	+ 4,3	42,6 ± 0,9	+ 8,8
Tampon citrique			37 ± 0,2	+ 3,2	38,75 ± 0,25	+ 4,95
Tampon formique			38,5 ± 0,2	+ 4,7	42,1 ± 0,9	+ 8,3

Il conviendra donc de ne pas exagérer cette concentration dans les cas particuliers où elle apparaît devoir être augmentée.

b) Etude en milieux naturels Moûts et Vins

Analyse d'un moût de raisins.

Moût c :
Acidité totale en g SO_4H_2/l, 3,2.
en méq/l, 65,3.
pH, 3,3.
Par addition :
de 100 et 50 méq d'acide tartrique par litre.
de 20 et 40 méq de KOH par litre.
ont été préparés :

les moûts :	*a*	*b*	*c*	*d*	*e*
de pH :	2,76	2,95	3,3	3,83	4,4

Le dosage de l'acide tartrique a été fait en triple ; les moyennes (expression en méq de bit./l) figurent dans le tableau XXXXIII.

En supposant exacts les résultats obtenus pour le moût pur par chacun des modes opératoires essayés, nous avons calculé et noté dans les colonnes Δ, les différences entre chacun des résultats obtenus par l'analyse et ce que nous aurions, dans ces conditions, dû trouver.

L'acide tartrique ajouté est retrouvé à moins d'1 méq près. D'autre part, les résultats sont, par les méthodes par concentration, identiques à 1 ou 1,5 méq près quels qu'aient été les tampons employés ; le tampon formique ne donne pas, ici, de résultats plus élevés que les autres.

La méthode sans concentration (mais avec un tampon acétique de pH 3,5 ou bien de 3,8) donne des nombres un peu faibles.

Sur un autre moût, modifié comme le précédent, ces même modes opératoires ont été comparés avec la méthode KLING au racémate de Ca, oxydimétrie permanganique.

Nous l'avons employée avec les modifications de PEYNAUD (15) , pour ce qui a trait à la précipitation du racémate et à sa purification.

Moûts :	*a*	*b*	*c*	*d*	*e*
pH :	2,76	2,96	3,37	3,79	4,25

2e EXPÉRIENCE

Consulter le Tableau XXXXIV

1° En se reportant aux résultats d'analyse de la solution d'acide tartrique pur, on voit la concordance des méthodes KLING et « tampon acétique ; concentration » avec le résultat titrimétrique direct à 0,19 méq près.

Seul, le tampon formique donne des résultats un peu trop élevés.

Tableau XXXXIII

	Solution d'acide tartrique	a	Δ	b	Δ	c (moût)	d	Δ	e	Δ
Titrimétrie directe (50,62 méq. bit) ..	101,25									
Tampon acétique (3,5) + alcool		82,83 ± 0,17	+ 0,88	57,58 ± 0,17	+ 0,94	31,33 ± 0,17	29,5 ± 0	— 1,8	28,75 ± 0	— 2,58
Tampon acétique concentration		84,91 ± 0,41	+ 0,38	58,66 ± 0,67	— 0,56	33,91 ± 0,16	33,91 ± 0,16	0	34 ± 0	+ 0,08
Tampon citrique concentration		85,66 ± 0,59	+ 0,71	59,93 ± 0,56	+ 0,29	34,33 ± 0,17	34,37 ± 0,22	+ 0,04	34,33 ± 0,25	0
Tampon formique concentration		83,83 ± 0,42	— 0,29	58,25 ± 0,75	— 0,56	34,5 ± 0,25	33,75 ± 0,25	— 0,25	34,00 ± 0,25	— 0,50
Moyenne des résultats obtenus par les 3 dernières méthodes		84,8 ± 0,9		58,61 ± 1,32		34,24 ± 0,33	34,01 ± 0,36		34,11 ± 0,22	

Tableau XXXXIV

	Bitartrate de K en Méq/l									
	Solution d'acide tartrique	Δ	a	Δ	b	Δ	c	d	Δ	e	Δ
Titrimétrie directe.....	51,06										
Kling	51,09 ± 0	+ 0,03	75,33 ± 0	— 15,84	65,75 ± 0,9	+ 0,11	40,11 ± 0,91	40,23 ± 0,6	+ 0,12	40,74 ± 1,73	+ 0,65
Tampon acétique (3,5) alcool	50,62 ± 0,13	— 0,44	86,96 ± 0,29	— 2,02	63 ± 0,5	+ 0,45	37,91 ± 0,34	37,62 ± 0,25	— 0,29	37,58 ± 0,46	— 0,33
Tampon acétique concentration ..	51,25	+ 0,19	90,08 ± 1,83	— 1,47	65,16 ± 0,16	— 0,86	40,5 ± 0,5	40,21 ± 0,42	— 0,29	40,87 ± 0,13	— 0,37
Tampon citrique concentration...	51,50 ± 0,43	+ 0,44	93,54 ± 0,75	+ 1,85	67,04 ± 0,33	+ 0,88	40,62 ± 0,13	40,5 ± 0,5	— 0,12	40,75 ± 0,25	+ 0,12
Tampon formique concentration..	53,06 ± 0,06	+ 1,7	92,75 ± 0,37	+ 0,85	66,79 ± 0,08	+ 0,43	40,83 ± 0,27	41,16 ± 0,66	+ 0,33	41,58 ± 0,17	+ 0,75
Moyenne des 3 méthodes par concentration.....			92,12 ± 2,04		66,33 ± 1,17		40,65 ± 0,18	40,62 ± 0,54		41,06 ± 0,52	

2e En se reportant à l'analyse du moût, on constate que les résultats obtenus par les méthodes par concentration sont identiques à moins du demi milliéquivalent près et correspondent à celui de la méthode KLING au milliéquivalent près.

Seule, la méthode tampon acétique-alcool apparaît déficiente (mais elle fut réalisée au pH 3,5 au lieu de 3,8 qui aurait dû être réalisé pour tenir compte de l'addition d'alcool effectuée).

3° En considérant les échantillons b, d et e, on constate que les méthodes « tampon ; concentration » donnent des résultats identiques à la méthode KLING au demi milliéquivalent près.

Sauf lors du dosage de la solution d'acide tartrique pur, les résultats donnés par la méthode KLING accusent des erreurs absolues nettement supérieures à celles correspondant aux méthodes « tampon-concentration ». Cela vient, en partie tout au moins, de difficultés rencontrées pour apprécier les moments de fin d'oxydation de l'acide tartrique lors du dosage de sa solution par la liqueur titrée de permanganate de potassium.

Nous n'avions pas tenu compte, il est vrai, de la proposition d'AGOSTINHO Fernando GUIMARAES (19) d'effectuer l'oxydation à 70-75°C, ce qui diminue les erreurs sans aboutir à la fidélité du dosage par le bichromate de potassium, tel que le préconise PUISSANT (voir plus loin).

L'influence d'une certaine quantité de tartrate gauche de calcium et le fait de ce que la réaction d'oxydation est mal connue et variable doivent aussi intervenir dans une certaine mesure ; ces inconvénients ont été signalés par PATO (18), POUX (20) et d'autres auteurs (voir GAROGLIO (17).

Les méthodes aux tampons citrique et formique donnent des résultats très légèrement supérieurs de 0,7 à 1,3 méq/l seulement (légèrement plus élevés dans le cas de la solution d'acide tartrique pur). Les résultats restent fort intéressants, à 1 à 2 méq près pour l'échantillon a, le plus riche en acide tartrique (teneur en cet acide, anormalement élevée pour un moût de raisin), si l'on considère les trois méthodes « tampon + concentration », l'erreur relative restant très faible ; la méthode « tampon acétique + alcool » apparaît légèrement déficiente (mais le tampon était à pH 3,5 au lieu de 3,8) et le résultat obtenu par la méthode KLING est ici nettement erroné.

En un mot, dans le cas des moûts, les résultats du dosage apparaissent encore plus précis, par concentration et emploi du tampon acétique, que les considérations antérieures ne permettaient de le prévoir.

Note : Pour le calcul de Δ, il n'a pas été utile de tenir compte de la dilution due à l'eau de la solution d'acide tartrique pur, l'addition de celle-ci ayant été faite directement dans les récipients devant servir au dosage.

Analyse d'un vin.

Pour tenir compte de ce que la teneur en acide tartrique des vins peut être anormalement faible à la suite de certains développements bactériens, l'analyse a été faite sur un vin naturel, puis ramené par de l'eau aux 2/3 et au tiers de son volume primitif.

Le tableau XXXXV rend compte des résultats, exprimés en méq de bitartrate de K/l.

Dans le cas du vin témoin, quelle que soit la méthode, mis à part le tampon citrique, les résultats diffèrent les uns des autres de moins d'un méq/l.

En les supposant exacts, nous avons calculé, pour les vins dilués, les différences Δ entre les nombres obtenus par l'analyse et ceux qui résultent du calcul ; les erreurs absolues sont inférieures au méq/l dans le cas de la méthode par concentration avec les tampons acétique et formique.

TABLEAU XXXXV

	Vin pur	Vin dilué aux 2/3		Vin dilué au 1/3	
			Δ		Δ
Méthodes sans concentration					
Tampon acétique (3,8) ; degré alcool 22°8	20,25 ± 0	12,06 ± 0,06	— 1,44	3,68 ± 0,06	— 3,07
Tampon formique (3,8) ; degré alcool 22°8	21,18 ± 0,06	13,12 ± 0	— 1,0		
Méthodes par concentration					
Tampon acétique (3,5)	20,87 ± 0,13	13,62 ± 0	— 0,28	6,06 ± 0,06	— 0,89
Tampon citrique (3,5)	18,75 ± 0,5	8,62 ± 0,13	— 3,88	0	— 6,25
Tampon formique (3,5)	21,18 ± 0,06	13,5 ± 0,13	— 0,62		

En définitive, la méthode qui donne les résultats les plus voisins de la réalité est la méthode « tampon acétique ; concentration » dans l'ensemble des cas, comportant même celui de vins de teneur relativement faible en acide tartrique.

Le tampon formique est lui aussi, intéressant. Il est préférable pour obtenir la précipitation parfaite du bitartrate de K lorsqu'on a l'intention de le purifier par une deuxième cristallisation.

Avec le tampon citrique, les résultats sont très déficients.

C. — CONCLUSIONS

Nous avons donc constaté que le dosage n'était pas perturbé, dans les limites de composition des vins ou de solutions légèrement plus concentrées, par les anions phosphate, sulfate et lactate, qu'il peut l'être par le fer en l'absence d'acide citrique à partir de 40 mg/l et par le calcium en milieu acétique, dans les moûts et les vins ayant une teneur anormale-

ment élevée en ce métal, mais qu'une addition d'oxalate de K ou d'un sel de K bien choisi éliminait cet ennui. Il ne faut cependant pas trop éxagérer l'excès de potasse déjà obtenu par addition de tampon.

Le plus gênant est l'acide malique, mais nous avons pu préciser les conditions à réaliser pour que son influence soit fort réduite.

1° *En milieux synthétiques.*

En l'absence d'acide malique, nos modes opératoires donnent d'excellents résultats, qu'il y ait peu ou beaucoup de calcium et d'acide sulfurique.

En présence d'acide malique, les résultats sont trop élevés de 1,3 à 3,7 méq/l et davantage si la concentration en ions potassium, qu'il convient donc de ne pas exagérer, est trop élevée.

La méthode « sans concentration, avec alcool » apparaît la meilleure (tampons acétique et formique).

Avec le tampon formique, les résultats sont trop élevés en présence d'acide malique.

Avec le tampon acétique, l'erreur par excès reste limitée à 1,3 méq/l, ce qui ramène, en fait, l'erreur à moins d'1 méq/l pour les moûts de raisins mûrs et les vins en résultant dont la teneur en acide malique est peu élevée et pour les vins ayant partiellement subi la fermentation malolactique.

Parmi les méthodes « comprenant une concentration », c'est aussi celle qui utilise le tampon formique qui donne les résultats les plus erronés par excès, mais seulement en présence de quantités trop grandes de K que l'on peut éviter ; cela vient vraisemblablement d'une précipitation plus complète du bitartrate de potassium à laquelle s'ajoute le bimalate entraîné. Le tampon citrique paraît, dans ce cas, des trois tampons à essayer, celui qui est à préférer, sans cependant qu'il se montre toujours supérieur au tampon acétique ; l'exactitude de ses résultats vient de ce que la précipitation du bitartrate de K n'est pas complète.

L'acide malique, gênant, comme nous l'avons vu, la cristallisation de l'acide tartrique, les résultats qui se rapprochent le plus de la réalité sont ceux pour lesquels s'est le mieux établie la compensation entre l'acide tartrique resté en solution et l'acide malique entraîné.

Il a été vérifié qu'il n'y avait entraînement, ni d'acide acétique, ni d'acide formique.

2° *Dans les moûts et les vins.*

La méthode « par concentration » nous a donné les meilleurs résultats, plus précis encore qu'en solution synthétique complexe, ce qui peut s'expliquer par l'existence d'une série d'influences très faibles, presque toutes nettement inférieures au méq/l et qui se correspondent mieux dans l'ensemble (tableau XXXXII).

Avec les moûts, chacun des tampons essayés a convenu.

Avec les vins, dont la teneur en acide tartrique peut être faible, seuls sont à conserver les tampons acétique et formique ; le premier se montre le meilleur sauf si l'on veut opérer par double cristallisation ; le tampon citrique est à abandonner, cependant, dans le cas de liquides anormalement riches en fer, une légère addition de ce tampon est alors favorable.

TABLEAU XXXXII

Récapitulation des causes d'erreur dans les conditions de dosage adoptées

	Négligeables dans les conditions requises de dosage.	*Négatives*	*Positives*
Bitartrate de K.....		Une portion très faible reste en solution (de l'ordre de 0,5 méq/l	
Acide malique.....		Diminue la vitesse de cristallisation du Bit. K	Précipite partiellement.
Acide lactique.....		Idem	Peut accroître très légèrement (jusque vers 0,7 méq/l) le résultat du dosage.
Acide phosporique	oui		
Acide sulfurique	oui		
Acide citrique		Négatives dans les conditions d'emploi du tampon citrique	
Acide acétique	oui		
Acide formique	oui		
Sodium	oui	A un excès anormal de Na correspond une diminution de la vitesse de cristallisation	
Calcium		Si le milieu est anormalement riche en Ca	
Fer	oui	Si le milieu est riche en fer et en l'absence d'acide citrique	
Mg	oui		
Sucres	oui		
Colloïdes		légère influence.	

III. — EXPOSÉ D'UNE NOUVELLE TECHNIQUE DE DOSAGE DE L'ACIDE TARTRIQUE SOUS FORME DE BITARTRATE DE POTASSIUM

A. — MODE OPÉRATOIRE DES MÉTHODES AU TAMPON

1) Solutions nécessaires

NaOH : N/20.

Tampons :

pH 3,5 dans le cas de la méthode par concentration.

pH 3,8 dans le cas de la méthode par l'alcool.

a) Composition des Tampons (par litre).

	Acide		KOH		H_2O
Tampons acétiques :	en grs/l	en éq/l	en grs/l	en éq/l	
pH 3,5	400	6,67	37	0,66	QS 1 000 cc
pH 3,8	400	6,67	53	0,95	QS 1 000 cc
Tampons formiques :					
pH 3,5	120	2,61	70	1,25	QS 1 000 cc
pH 3,8	120	2,61	85	1,52	QS 1 000 cc
Tampon citriques					
pH 3,5	170	2,65	49,8	0,89	QS 1 000 cc

Les tampons acétique et formique se conservent très bien en flacons bouchés.

b) Préparation des Tampons.

CH_3COOH : *dédoubler avec de l'eau, l'acide commercial pur ; on obtient ainsi une solution environ 8,9 N correspondant à* 530 *g/l de* CH_3COOH. *La titrer.*

HCOOH : *porter 200 cc d'acide du commerce pur à 1 000 cc. On obtient ainsi une solution environ 5,2 N correspondant à 240 g/l.*

KOH : *Préparer une solution concentrée à 500 g/l. La conserver au moins 12 heures à la glacière. Au moment de l'emploi, filtrer sous vide en se servant d'un filtre de Gooch n° 4. Couper le vide avant épuisement du liquide sur le filtre pour éviter tout entraînement de carbonate.*

Ramener par dilution (20 cc dans 100) à env. N et titrer (par 10 ou 20 cc).

2) Modes opératoires

A) Méthode par concentration (celle que nous conseillons).

Prélever 20 cc de vin (ou de moût), les mettre dans une capsule de 50 cc. Concentrer jusqu'à 7 cc (utiliser, soit une capsule en verre pyrex graduée, soit une capsule témoin supplémentaire dans laquelle 7 cc de liquide auront été mesurés). Laisser refroidir. Ajouter 4 cc de tampon (pH 3,5). Agiter aussitôt après, avec une baguette de verre, en frottant contre les parois afin de favoriser la cristallisation du bitartrate de K. Mettre la capsule dans une glacière à 2°C. (Dans le cas du tampon acétique placer la capsule sous cloche, en raison de la volatilité de cet acide.)

Au bout de 4 jours (durée de cristallisation à respecter), laver les cristaux avec de l'alcool à 50°, saturé de bitartrate de K (vaseliner au préalable le bec verseur de la capsule) et filtrer sur un filtre de Gooch n° 3 ou n° 4. Faire 4 lavages avec cet alcool, puis dissoudre les cristaux dans de l'eau distillée en pleine ébullition.

Titrer l'acidité par de la soude N/20. Soit n cc versés. Ce résultat exprimé en méq/l de bitartrate est 2,5 n.

B) Méthode par l'alcool sans concentration.

Rappelons qu'elle est déficiente pour les vins et les liquides trop loin de la saturation en bitartrate de K.

Prélever 20 cc de vin (ou de moût), les mettre dans un erlenmeyer de 200 cc.

Dans le cas des moûts, ajouter 5 cc d'alcool à 95°. (Le degré alcoolique final du mélange sera de 16°3.)

Dans le cas des vins, ajouter le volume n cc d'alcool utile pour obtenir approximativement ce même degré : n cc d'alcool à 95° = 5 — 0,21 d, formule dans laquelle d représente le degré alcoolique du vin. Ajouter également 5 cc — n cc d'eau.

Mettre 4 cc d'un des tampons pH = 3,8. Placer l'erlenmeyer dans une glacière à 2°C.

Au bout de 4 jours, continuer le dosage comme précédemment.

NOTA. — Ces méthodes peuvent être conduites en série de 6 ou de 8 essais ; utiliser alors une rampe à vide pour les filtrations.

B. — COMPARAISON AVEC LES MÉTHODES OXYDIMÉTRIQUES ET AU RACÉMATE DE CALCIUM

(*Milieux synthétiques, moûts et vins*).

Il est intéressant de comparer les méthodes de dosage de l'acide tartrique, ainsi améliorées, avec celles basées sur sa précipitation à l'état de racémate de calcium que l'on considère normalement comme beaucoup plus précises.

Nous avons déjà vu que la méthode KLING modifiée par PEYNAUD s'était révélée inférieure du fait de la difficulté rencontrée pour préciser la fin de l'oxydation, sans oublier que la réaction d'oxydation se produit suivant une relation imprécise.

Comparons maintenant la méthode PASTEUR-REBOUL et nos modes opératoires qui ont eu celle-ci pour origine, avec la méthode PUISSANT ; rappelons que cette dernière réalise la précipitation et la purification de l'acide tartrique à l'état de racémate de Ca suivant le mode opératoire de KLING, modifié par PEYNAUD (1) (15), et POUX (12), mais que le titrage de l'acide tartrique ainsi séparé se fait par oxydation sulfochromique.

PLAN GÉNÉRAL DE L'ESSAI

I. — Sur solutions aqueuses synthétiques.
Simples de bitartrate de K.
Complexes.
II. — Sur moût
dont le pH a été modifié par addition de quantités connues :
soit d'acide tartrique,
soit de potasse.
III. — Sur vin
dont la teneur en acide tartrique a été modifiée par dilution avec de l'eau, ou par addition d'acide tartrique.

I. — Essai sur solutions synthétiques.

Composition des solutions d'acide tartrique (27 mmol/l ; 13,5 mmol/l).
Composition du milieu complexe.

Pour faciliter l'expérimentation, nous avons opéré de la façon suivante : à une prise convenable de solution de bitartrate de K à 27 ou 13,5 méq/l ont été ajoutés ou non des volumes connus de différentes solutions.

Cela revenait à analyser, lorsqu'étaient faites ces additions, des milieux de composition suivante :

Bitartrate de K en méq/l	27,5 méq/l ou 13,5 méq/l
Acide malique	5,4 g/l soit 80,6 méq/l
SO_4K_2	0,625 g/l
Cl_2Ca	0,47 g/l soit 0,17 gr/l de Ca
PO_4KH_2	0,8 g/l
pH	2,94 ou 2,78

Résultats : Voir les tableaux :
27 méq/l de Bit. K :
XXXVI A — Sol. pure de Bit. K.
XXXVI A' — Sol. complexe.
13,5 de Bit. K.
XXXVI B — Sol. pure de Bit. K.
XXXVI B' — Sol. complexe.

a) En solution synthétique pure, toutes les méthodes essayées ont donné de bons résultats (moins de 2 ou parfois 3 méq/l de différence avec le résultat titrimétrique), la méthode PASTEUR-REBOUL comprise, réalisée ici au pH favorable. Les moins bonnes sont les méthodes à l'alcool, sans concentration.

b) En solution synthétique complexe, les méthodes par concentration donnent de bons résultats ; les autres apparaissent légèrement inférieures.

Le dernier essai des tableaux A' et B' (solution de bitartrate de K plus acide malique, sans autre composé) montre que c'est l'acide malique qui perturbe légèrement la méthode PUISSANT.

TABLEAU XXXVI A

ESSAI SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Solution de bitartrate (Bitartrate de K en méq/l)
Dosage acidimétrique de la solution : 27 méq/l de Bitartrate.

	Moyenne de 3 résultats	Différence avec rés. titrimétr.	Erreur % de bitartrate
Méthodes tampons:			
Par concentration:			
Tampon acétique	26,56 ± 0,31	— 0,44	— 1,6
Tampon formique	26,87 ± 0,50	— 0,13	— 0,5
Méthode alcool:			
Tampon acétique	27,04 ± 0,33	+ 0,04	+ 0,15
Tampon formique	27,58 ± 0,42	+ 0,58	+ 2,1
Méthode Pasteur Reboul:	27,75 ± 0	+ 0,75	+ 2,8
Méthode Puissant:			
Dosage acidimétrique de la solution : 26,3 méq/l	26,46 ± 0,32	+ 0,16	+ 0,6

TABLEAU XXXVI A'

ESSAI SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Solution complexe (Bitartrate de K en méq/l).
Dosage acidimétrique de la solution : 27 méq/l.

	Moyenne de 3 résultats	Différence avec rés. titrimétr.	Erreur % de bitartrate
Méthodes tampons:			
Par concentration:			
Tampon acétique	28,85 ± 0,30	+ 1,85	+ 6,9
Tampon formique	28,66 ± 0,29	+ 1,66	+ 6,2
Méthode alcool:			
Tampon acétique	26,81 ± 0,19	— 0,19	— 0,7
Tampon formique	27,31 ± 0,21	+ 0,31	+ 1,2
Méthode Pasteur Reboul:	30,01 ± 0,29	+ 3,01	+ 11,2
Méthode Puissant:			
Dosage acidimétrique de la solution : 26,3 méq/l	29,65 ± 0,25	+ 3,35	+ 12,8
Dosage solution de bitartrate + acide malique (80 méq/l)	29,9 ± 0,5	+ 3,6	+ 13,5

Tableau XXXVI B

ESSAI SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Solution de bitartrate (Bitartrate de K en méq/l).
Dosage acidimétrique de la solution : 13,5 méq/l.

	Moyenne de 3 résultats	Différence avec rés. théorique	Erreur % de bitartrate
Méthodes tampons:			
Par concentration:			
Tampon acétique	12,87 ± 0,13	— 0,63	— 1,7
Tampon formique	13 ± 0	— 0,5	— 3,7
Méthode alcool:			
Tampon acétique	12,65 ± 0,4	— 0,85	— 6,3
Tampon formique	12,54 ± 0,54	— 0,96	— 7,1
Méthode Pasteur Reboul:	13,83 ± 0,21	+ 0,33	+ 2,5
Méthode Puissant:			
Dosage acidimétrique de la solution : 13,12 méq/l	12,9 ± 0,1	— 0,6	— 4,5

Tableau XXXVI B'

ESSAI SUR MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Solution complexe (Bitartrate de K en méq/l).
Dosage acidimétrique de la solution : 13,5 méq/l.

	Moyenne de 3 résultats	Différence avec rés. théorique	Erreur % de bitartrate
Méthodes tampons:			
Par concentration:			
Tampon acétique	14,21 ± 0,54	+ 0,71	+ 5,2
Tampon formique	13,68 ± 0,18	+ 0,18	+ 1,3
Méthode alcool:			
Tampon acétique Tampon formique	Résultats déficients déjà constatés (tab. A')		
Méthode Pasteur Reboul:	15,12 ± 0,38	+ 1,62	+ 12
Méthode Puissant:			
Dosage acidimétrique de la solution : 13,12 méq/l.	14 ± 0,31	+ 0,88	+ 6,7
Dosage : solution de bitartrate + acide malique (80 méq/l)	13,93 ± 0,24	+ 0,81	+ 6,2

II. — Essai sur du moût.

Composition du Moût.
Moût de Carignan 1954.
Densité 1074,5.
Acidité totale 128 méq/l (6,4 g/l).
pH 3,04.

Plan de l'essai.

Addition d'acide tartrique : pH de ces solutions.....	Moût + 100 méq/l d'ac. tar. 2,69	Moût + 50 méq/l Ac. T 2,83
Addition de potasse : pH de ces solutions.....	Moût + 20 méq/l KOH 3,37	Moût + 40 méq/l KOH 3,61

Méthode Pasteur-Reboul et méthodes Tampons.

Quantité d'acide tartrique ajouté par litre de moût : 99 méq/l et 49,875 méq/l.

Quantité de potasse ajoutée par litre de moût : 40 et 20 méq/l.

Méthode Puissant.

Quantité d'acide tartrique mis par litre de moût : 100,5 méq/l et 50,5 méq/l.

Quantité de potasse mise par litre de moût : 40 et 20 méq/l.

Interprétation du tableau XXXVII.

Remarquons d'abord que toutes les méthodes au tampon concordent, le tampon formique donnant des résultats un peu plus élevés dans le cas de l'échantillon riche en acide tartrique. La méthode PASTEUR-REBOUL apparaît partout déficiente sauf au voisinage du pH 3,6, comme on pouvait s'y attendre. Cependant, en milieu synthétique, elle donnait des résultats trop élevés, au contraire ; la différence de comportement dans ces deux cas s'explique par :

1° La teneur élevée des solutions synthétiques en acide malique.

2° Dans le moût, les facteurs de retard de cristallisation sont plus nombreux et efficaces, comme nous avons vu.

La méthode PUISSANT donne toujours des résultats plus élevés que les méthodes précédentes ; il s'agit de savoir, des méthodes au tampon et de la méthode PUISSANT, quelle est celle qui donne les résultats les plus exacts. Nous avons comme possibilité d'étudier dans quelles proportions ces méthodes permettent de retrouver l'acide tartrique ajouté au moût : elles les retrouvent toutes, sauf la méthode PASTEUR-REBOUL ; cependant les méthodes sans concentration aboutissent à cet égard à des résultats un peu plus élevés, les méthodes au tampon acétique et PUISSANT apparaissent comparables.

Nous avons vu que l'acide malique a, dans le cas de la méthode PUISSANT comme pour les autres méthodes, un effet perturbateur. Or, le racémate de calcium est particulièrement insoluble et l'on admet qu'il est pratiquement précipité. L'erreur, s'il en est bien ainsi, ne peut être réalisée que par excès suivant, d'ailleurs, ce que montrent nos essais en milieu synthétique, il est vrai limités à cet égard. PUISSANT (12) a signalé lui-même, que « dans un milieu complexe contenant, outre l'acide tartrique, les acides malique et citrique, les résultats sont un peu élevés ».

Tableau XXXVII

Essais sur Moût (Résultats en méq. de bitartrate de K par litre)

	(1) Moût + 50 mmol acide tart.	(2) Moût + 25 mmol acide tart.	(3) Moût	(4) Moût + 20 méq KOH	(5) Moût + 40 méq KOH	Acide tartrique ajouté retrouvé par l'analyse		Différence avec le résultat théoriquement prévu	
						(1)	(2)	(1)	(2)
Mmol. d'acide tartrique ajouté par litre (alcalimétrie)	49,5	24,93	0	0	0	49,5	24,93		
pH de la solution analysée	2,69	2,83	3,04	3,37	3,61				
Méthodes au tampon:									
Par concentration:									
Tampon acétique	82,12 ± 0,38	56,85 ± 0,15	31 ± 0,75	31,16 ± 0,59	30,87 ± 0,5	51,12	25,85	+ 1,62	+ 0,92
Tampon formique	85 ± 0,5	58,71 ± 0,21	32,4 ± 0,22	32,79 ± 0,08	32,68 ± 0,07	52,6	26,31	+ 3,1	+ 1,38
Sans concentration: avec alcool:									
Tampon acétique	82,54 ± 0,54	56,33 ± 0,67	29,87 ± 0,25	28,45 ± 0,83	28,06 ± 0,19	52,67	26,46	+ 3,17	+ 1,53
Tampon formique	84,12 ± 0,25	58,12 ± 0,39	31,12 ± 0,75	27,91 ± 0,59	27,53 ± 0,41	53	27	+ 3,5	+ 2,07
Méthode Pasteur Reboul:	64,37 ± 1,75	48,12 ± 1,50	21,93 ± 0,44	25,7 ± 1,92	29,56 ± 0,06	42,44	26,19	— 7,06	+ 1,26
Méthode Puissant:									
Mmol. d'ac. tartrique ajouté par litre (rés. alcalimétrique)	50,25	25,25							
	83,93 ± 0,19	61,06 ± 1	35,33 ± 0,08	34,52 ± 0,47	34,38 ± 0,89				
Rés. précédents ramenés au cas des analyses « concentration ; t. acét. »	83,18	60,74	35,33	34,52	34,38	47,85	25,41	— 1,65	+ 0,48
Différence entre rés. Puissant et « concentration ; t. acétique »	+ 1,06	+ 3,89	+ 4,33	+ 3,36	+ 3,51				

Note : Chaque nombre est la moyenne de trois dosages d'une même solution par la même méthode.

Il est logique de penser que cette erreur doit être d'autant plus faible que le rapport $\frac{\text{acide tartrique}}{\text{acide malique}}$ dans la solution à doser est plus élevé.

Il se trouve que c'est justement dans ce cas que les résultats donnés par les deux meilleures méthodes sont les plus voisins, sans pouvoir affirmer que l'erreur par la méthode « concentration » n'est pas, aussi ici, très légèrement par excès.

En somme, deux faits :

1° L'influence accroissante de l'acide malique sur les résultats dans les conditions du dosage.

2° La plus faible différence entre les 2 procédés analytiques considérés lorsque le rapport $\frac{\text{acide tartrique}}{\text{acide malique}}$ est élevé,

tendent à faire penses qu'en présence d'acide malique, la méthode Puissant donne des résultats très légèrement erronés par excès. Quant à la méthode « concentration, tampon acétique » elle apparaît valoir cette dernière ou lui être très légèrement supérieure ; ce dernier point ne saurait cependant être affirmé.

III. — Essai sur du vin.

Nous avons opéré sur un vin blanc dont la composition est indiquée ci-dessous.

Densité	999,6
Alcool	10°5
Ac. totale	5 g/l (102 méq/l)
Ac. volatile	0,34 g
Ac. fixe	4,55 g
Extrait sec	29,15 g
pH	2,9

Ce vin a été analysé tel quel, dilué aux 2/3 et au 1/3.

Deux essais ont été faits.

— Le premier, exécuté comme indiqué précédemment, ne nous a pas donné satisfaction, les concentrations en acide tartrique étant trop faibles.

— Le second a comporté la modification suivante : addition au vin dilué au tiers de 20 méq d'acide tartrique par litre.

— Pour le dosage par la méthode Puissant, la prise d'essai fut de 10 cc de vin aux 2/3, comme pour le vin non dilué ; 30 cc de vin au 1/3.

Résultats :

1er essai : Tableau XXXVIII.

2e essai : Tableau XXXIX.

Tableau XXXVIII

1er *essai sur vin.*

Premier essai sur vin

	Vin pur	Vin dilué aux 2/3 environ (1)			Vin dilué au 1/3 et enrichi (1)		
		Moyenne de 3 résultats analytiques	Rés. déduits de la 1re colonne	Différ.	Moyenne de 3 résultats	Rés. déduits de la 1re colonne	Différ.
Méthode au tampon							
Par concentration							
Tampon acétique	14,24 ± 0,13	8,68 ± 0,43	9,25	— 0,57	2,5 ± 0,5	4,27	— 1,77
Tampon formique	14,54 ± 0,71	8,37 ± 0,13	9,45	— 1,08	0,79 ± 0,54	4,36	— 3,57
Méthode Puissant	16,52 ± 0,16	13,49 ± 0,99	10,73	+ 2,76	5,69 ± 0,11	4,95	+ 0,74

(1) Pratiquement pour le vin aux 2/3 : 650 cc de vin portés à 1 000 cc avec de l'eau ;
pour le vin au 1/3 : 300 cc de vin portés à 1 000 cc avec de l'eau.

Tableau XXXIX

2e *essai sur vin.* (*Résultats en méq de bit. de K par litre.*)

	Vin pur	Vin dilué aux 2/3 env. (b)			Vin au 1/3 env. et enrichi (b)		
		Moyenne de 3 résultats analytiques.	Rés. déduits de la 1re col.	Différence	Moyenne de 3 rés.	Rés. déduits de la 1ere col. (a)	Différence
Mmol. d'ac. tartrique ajoutées par litre (alcalimétrie)	0	0			10,12		
Méthodes au tampon							
Par concentration							
Tampon acétique...	14,62 ± 0	8,81 ± 0,06	9,5	— 0,69	14, 5 ± 0	14,5	0
Tampon formique ..	14,57 ± 0, 2	8,45 ± 0,55	9,47	— 1,02	14,43 ± 0,07	14,49	— 0,6
Méthode Pasteur-Reboul	19,18 ± 0,18	12, 2 ± 0,33	12,46	— 0,26	12, 5 ± 0	15,87	+ 3,37
Méthode Puissant.....	15,58 ± 0,46	9,71 ± 0,22	10,12	— 0,61	14,62 ± 1,13	14,88	— 0,26
Différence entre rés. Puissant et « concentration; tampon acétique »	+ 0,96	+ 0,9			+ 0,12		

(a) Résultats déduits de la 1re colonne, compte tenu de l'addition d'acide tartrique.
(b) Pratiquement : pour le vin aux 2/3 : 650 cc de vin portés à 1000 cc avec de l'eau.
pour le vin au 1/3 : 300 cc de vin portés à 1000 cc avec de l'eau; + 10,12 mmol d'acide tartrique par litre.

Interprétation des tableaux précédents.

1er *Essai* : Il montre qu'à faible dilution (teneur en bit. K inférieure à 5 méq/l), la méthode Puissant est plus exacte ; cela vient de la possibilité d'augmenter la prise. L'addition de quantités connues de bitartrate de K remédie à cet inconvénient pour la méthode « tampon-concentration » (2e essai).

2e *Essai* : Sans concentration, les résultats obtenus ont été nettement erronés par défaut ; nous ne les donnons pas.

On constate ici une excellente concordance entre les méthodes « concentration ; tampon acétique ou formique » et PUISSANT.

La teneur moindre du vin en acide malique en est logiquement l'explication ; notons cependant que, d'après la méthode approximative utilisée (méthode chromatographique PASCAL RIBEREAU-GAYON (21)), elle serait de 25 p. 100 seulement inférieure à celle du moût et de la solution synthétique précédemment étudiée.

Cette concordance entre les 2 méthodes envisagées est d'autant meilleure que la dilution est plus grande ; cela s'explique par la plus faible concentration de l'acide malique et par l'augmentation, pour le dernier vin, du rapport $\frac{\text{acide tartrique}}{\text{acide malique}}$ qui tend à diminuer l'erreur par excès de la méthode PUISSANT et à accroître au contraire, pour ce dernier vin, celle des méthodes au tampon.

C. — CONCLUSION

La méthode PUISSANT (titrage sulfochromique), plus précise que la technique KLING (titrage permanganique), — l'une et l'autre séparant l'acide tartrique à l'état de racémate de Ca — est, comme les méthodes basées sur la cristallisation de bitartrate de K, influencée par l'acide malique qui provoque des erreurs par excès.

Notre expérimentation montre que, la méthode « par concentration ; tampon acétique ou formique » lui est au moins comparable, peut-être même supérieure.

IV. — RÉSUMÉ ET CONCLUSION

Nous avons précisé le pH le plus favorable à l'insolubilisation du bitartrate de K, 3,45 à 3,55 dans le cas des solutions aqueuses et moûts ; 3,6 à 3,8 dans le cas des vins, ce qui nous a conduits à adopter des tampons de pH 3,5 (méthode avec concentration) et 3,8 (méthode à l'alcool sans concentration).

Nous avons ensuite travaillé à fixer des conditions de concentration et de température, de manière à limiter le plus possible, l'influence des facteurs d'erreur.

1° Vitesse de cristallisation.

Fonction bien entendu de la sursaturation en bitartrate de K, donc de la concentration et de la température, elle dépend aussi, mais de façon négligeable dans les conditions de dosage précisées, de la teneur du milieu en sucres et en colloïdes, bien davantage de sa teneur en acide

malique, dans une mesure qui n'est pas tout à fait négligeable de l'ensemble des actions entre les molécules variées des milieux naturels.

2° Influence perturbatrice de l'acide malique.

C'est le facteur le plus gênant.

Cet acide diminue la vitesse de cristallisation du bitartrate de K et s'insolubilise partiellement avec lui. Tout se passe comme si c'était sous forme de bimalate de K. Tout se passe comme s'il y avait interaction moléculaire entre ces sels acides (et entre leurs ions) et formation d'une combinaison labile dissociable en ions dont le produit de solubilité influe sur la solubilité apparente de l'acide tartrique (liaisons esters et peut-être aussi hydrogène). Cela peut n'être qu'un phénomène physique d'orientation et d'attraction entre molécules.

Nous sommes arrivés :

1° A limiter considérablement l'entraînement de bimalate de K en réduisant la concentration que PASTEUR-REBOUL faisait subir au liquide.

2° A précipiter l'acide tartrique plus complètement grâce à la réalisation du pH le plus favorable à l'insolubilisation du bitartrate de K.

Le dosage n'est précis que dans la mesure où il y a compensation entre le bimalate de K entraîné dans les cristaux et le bitartrate resté en solution. C'est, en solutions aqueuses synthétiques simples, au pH 3,3 qu'elle se réalise le mieux, mais dans les moûts et les vins existent d'autres facteurs diminuant la vitesse de la cristallisation, de telle sorte que, pour ces liquides, ce sont les pH optima précédemment établis qui doivent être choisis. La nature et la quantité de tampon qui déterminent, outre le pH, la concentration en ions K^+ et par suite, l'insolubilisation des bitartrates et bimalates de K ne sont pas sans importance.

Dans les conditions de nos modes opératoires (durée limitée de cristallisation) l'effet du retard de cristallisation, qui est plus élevé que celui de l'entraînement du bimalate de K lorsque le rapport $\frac{\text{acide tartrique}}{\text{acide malique}}$ est faible, compense approximativement celui-ci.

Il est difficile de préciser les valeurs de ce rapport pour lesquelles ces deux effets s'annulent parfaitement car ils sont fonctions de plusieurs facteurs et en particulier de la concentration de la solution en acide tartrique.

Nos analyses de moûts et de vins avec un tampon de pH 3,5 permettent de retrouver les quantités d'acide tartrique ajoutées à ces liquides ; l'action perturbatrice de l'acide malique est donc pratiquement annulée dans les conditions que nous avons précisées.

3° Influence des autres anions.

Les sulfates et phosphates des vins ne perturbent pas le dosage.

Ajoutons que la présence dans le vin d'acide métatartrique à la con-

centration de 10 g/hl diminue très légèrement le résultat mais dans la limite des erreurs expérimentales.

4° Influence des cations autres que l'ion K.

Avec le tampon acétique, le calcium donne un précipité de tartrate de calcium ; avec les tampons acétique et formique, le fer maintient de l'acide tartrique en solution (ferritartrates), ce n'est cependant qu'avec des teneurs élevées en ces cations que le dosage se trouve perturbé.

***

Nous avons particulièrement étudié deux modes opératoires :

a) L'un d'eux devient déficient en solution de bitartrate de K trop loin de la saturation ; il manque en particulier de sûreté dans le cas des vins.

Addition de 5 cm³ d'alcool à 20 cc de solution à doser ; pas de concentration ; addition de 4 cc de solution tampon pH 3,8.

b) L'autre est très intéressant : concentration jusqu'à 7 cc de 20 cc de solution à doser et addition de 4 cm³ de solution tampon.

Le tampon acétique donne des résultats régulièrement exacts, sauf dans le cas exceptionnel d'excès de Ca (addition d'oxalate de K à faire).

Le tampon citrique donne des résultats déficients lorsqu'on part de solutions de bit. K trop loin de la saturation ; il est, par suite à déconseiller.

Le tampon formique donne des résultats trop élevés en solutions aqueuses saturées complexes, mais exacts dans les moûts et les vins.

L'un ou l'autre des tampons acétique ou formique peut être employé.

Cependant, dans le cas de moûts ou de vins trop anormalement riches en fer (l'erreur par défaut est d'ailleurs très faible pour des teneurs en fer atteignant 40 mg/l) ou en calcium, il y a avantage à prendre certaines précautions supplémentaires :

a) addition d'un peu de tampon citrique dans le cas du fer : 3 cc de tampon acétique ou formique + 2 cc de tampon citrique ;

b) ou d'oxalate de K (ou même de sulfate de K) dans le cas du calcium, si on utilise le tampon acétique.

Une troisième méthode :

« Sans concentration ; 20° d'alcool ; tampon pH4 ; double cristallisation »

paraît susceptible de donner des résultats intéressants dans les milieux particulièrement riches en acide malique, pour éliminer l'influence de celui-ci ; mais elle est longue. Une étude plus approfondie serait nécessaire si l'on envisageait de l'utiliser.

Conclusion :

Les méthodes basées sur la précipitation de l'acide tartrique à l'état de racémate de Ca et sur la mesure de celui-ci par oxydimétrie ont été récemment adoptées (1956) comme méthodes officielles internationales d'analyse de ce constituant des vins (1) (parmi celles-ci, la méthode KLING fut recommandée par la Convention Internationale de 1935).

Sur la proposition de l'un de nous au Congrès de l'Office International du Vin à Narbonne (1951), la méthode par précipitation de l'acide tartrique à l'état de bitartrate de potassium à pH 3,5 (méthode PASTEUR-REBOUL modifiée par nous) a été choisie, dans le cadre des « méthodes d'analyse rapides, plus simples, mais généralement moins précises, qui pourront aussi être employées, en particulier en vue de transactions commerciales à l'intérieur de chaque pays ».

D'après les résultats de notre travail, et en tenant compte des modifications que nous en avons déduites (technique « au tampon avec concentration »), elle s'applique aux moûts et aux vins et possède la rigueur des méthodes dites précises sans avoir perdu la rapidité ni la simplicité de la méthode PASTEUR-REBOUL (2).

Son exactitude (± 1 méq par litre) s'est montrée, dans nos essais d'analyse des moûts et des vins, supérieure à celle de la méthode KLING (1), compte tenu des modifications de PEYNAUD (Titrage permanganique), et au moins comparable à la technique PUISSANT (12) (Titrage sulfochromique) : toutes deux assez longues et délicates.

Cette dernière méthode a sur la précédente l'avantage d'utiliser un titrage oxydimétrique de réaction connue et virage net, mais avec la même technique de précipitation, l'inconvénient de supporter, elle aussi, les perturbations dues à l'acide malique.

Elle a, sur notre mode opératoire, l'avantage d'être utilisable pour de très faibles teneurs du vin en acide tartrique, inférieures à 5 millimol. par litre, étant donné que l'on peut augmenter la prise d'essai, ce que nous ne pouvons envisager.

Dans les deux cas, l'addition à la prise, de quantités connues de bitartrate de K, peut être prévue.

De toutes façons, pour de si faibles concentrations en acide tartrique, l'erreur relative ne peut être qu'élevée.

Reçu pour publication le 23 Mai 1957.

(1) Décret n° 56-1381 du 18 décembre 1956 portant publication de la convention internationale pour l'unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins, 13 octobre 1954.

(2) La méthode PASTEUR-REBOUL, elle, est inapplicable aux moûts et aux vins doux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) JAULMES (P.). — Traité d'Analyse des Vins, 2e édition, 1951.
(2) PASTEUR (L.). — Études sur le Vin, 2e édition, Savy, Paris, p. 268, 1873.
(2a) RIBÉREAU-GAYON (J.). — Les Facteurs de Solubilité des Suspensions constituées dans les Vins. *Soc. Sc. Phys. Bordeaux*, **54,** 1932-1933.
(3) SEMICHON (L.), FLANZY (M.) et Mlle LAMAZOU-BETBEDER. — Dosage de la Potasse et des Alcalis dans les Moûts et dans les Vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **263,** p. 517, 1930.
(3a) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Dosage de l'acide tartrique dans les moûts et les vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **295-296,** p. 403, 1933.
(4) VENTRE (J.). — Sur l'Acidification de la Vendange et des Moûts. *Ann. Ec. Nat. Agr. Montpellier*, **23,** fasc. 3, p. 127, 1934.
(5) BIEDERMANN. — Les modifications du pH lors de la précipitation de tartre dans les boissons. *Mitt. Lebensmittel. u. Hygiene*, **42,** fasc. 5, p. 476-482, 1951.
(6) DA COSTA (E. N.). — American Soc. of Enologists Proceedings, Davis, (Calif.), 9-10-11 juillet 1952.
(7) GAUTIER (J. A.). — Les Acides et les Bases, vus par l'Analyste et l'Acidimétrie en milieu non aqueux. *Chimie Analytique*, **35,** n° 2, p. 31, février 1953.
(8) DUTOIT (P.) et DUBOUX (M.). — Analyse des Vins par Volumétrie physico-chimique, 1912.
(9) DUBOUX (M.) et TSAMADOS. — *Helvetica Chim. Acta*, **7,** 874, 1924.
(10) NÈGRE (E.). — Les pH remarquables des Moûts et des Vins et leurs Applications. *C. R. Acad. Agr. France*, 16 déc. 1953.
(11) GENEVOIS (L.) et RIBEREAU-GAYON (J.). — *Ann. Brass. Distill.*, **31,** p. 277, 1933.
(12) PUISSANT (A.). — L'Oxydation sulfo-chromique de l'acide tartrique et son dosage dans les Moûts et les Vins. *Ann. Technol.*, **1,** p. 57, janv.-mars 1954.
(13) BRUNEL (A.). — Traité pratique de Chimie végétale, **1**, p. 315, 1948.
(14) KOLTHOFF et STENGER. — Volumetric Analysis, 1942.
(15) RIBEREAU-GAYON (J.) et PEYNAUD (E.). — Analyse et Contrôle des Vins. — PEYNAUD (E.). — *Ann. Fals. Fr.*, p. 260, 1936.
(16) GRIGNARD (V.). — *Traité de Chimie Organique*, **11,** 293, 1945. — KOLTHOFF. — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **47,** 861, 1928 (réf. 26). — JONES et SOPER. — *J. Chem. Soc. London*, 1934-1936 (réf. 27). — AUERBACH. — *Z. Physik. Chem.*, 110-109 (réf. 28). — DATTA et DHAR. — *J. Chem. Soc. London*, 107-826, 1915 (réf. 29).
(17) GAROGLIO (P. G.). — Nuevo Trattato di Enologia ; *III*, 1953.
(18) MARIO PATO. — *Bull. Off. intern. Vin*, n° 161, p. 59 et n° 162, p. 84, 1944.
(19) AGOSTINO FERNANDES GUIMARDES. — Anaïs do Instituto do Vinho de Porto. 1er volume, 1950.
(20) POUX (G.). — Sur le Microdosage de l'acide tartrique dans les vins et les moûts. *Ann. Fals. Fraudes* (XLII), **490-492,** p. 439-443, oct.-déc. 1949.
(21) RIBEREAU-GAYON (P.). — Évaluation de l'acide malique des vins par chromatographie sur papier. *Ann. Fals. Fraudes*, n° 541-542, p. 3, janv.-févr. 1954.
(22) FRANCOT (P.) et GEOFFROY (P.). — Bull. Off. Int. Vin, **242,** p. 97, 1951.
(23) FABRE (J. H.) et BRÉMOND (E.). — Moûts et Vins provenant de vendanges eudémisées. *Ann. Fals. Fraudes*, **227,** p. 524, 1927. — Moûts et Vins provenant de vendanges eudémisées (2e étude) ; *Ann. Fals. Fraudes*, **235,** p. 323, 1928.

EMPLOI DES ALGINATES POUR LA DÉFERRISATION DES VINS

PAR

L. DEIBNER et P. BENARD

Station Centrale de Technologie de Produits Végétaux. Narbonne.

I. — INTRODUCTION

L'élimination de l'excès de fer dans les vins constitue un problème œnochimique important. Jusqu'à nos jours sa résolution reste imparfaite en raison des inconvénients découlant de l'emploi de produits déferrisants tels que le ferrocyanure de potassium à l'inocuité relative ou des sels de l'acide phytique d'un emploi délicat. Rappelons que les traitements curatifs faisant appel soit à l'acide citrique, produit légal dans la plupart des pays vinicoles, soit aux polyphosphates ou aux sels de l'acide éthylènediamine tétracétique, produits illicites, sont basés sur la dissimulation du fer sous forme de complexes solubles dans les vins.

Malgré l'efficacité plus ou moins grande des substances déferrisantes, leur apport, en général excédentaire, présente un danger au point de vue de modification de la constitution ou de la tenue ultérieure des vins.

Dans ces conditions, une substance moins soluble, non toxique, s'éliminant facilement même en présence de son excès présenterait un intérêt évident.

Au premier abord, les sels de l'acide alginique paraissent posséder ces qualités. Les essais sur la possibilité de leur emploi comme clarifiant et déferrisant ont été effectués à l'étranger.

Intéressés par la diversité des conclusions auxquelles ont abouti des œnologues russes, nous avons entrepris la tâche de vérifier l'efficacité de l'acide alginique, comme déferrisant, sur les vins de notre région.

II. — UTILISATION DE L'ACIDE ALGINIQUE POUR LES TRAITEMENTS DES VINS

A. — Propriétés de l'acide alginique.

Le polysaccharide connu sous le nom d'acide alginique constitue un des composants des parois cellulaires des algues *Macrocystis, Lami-*

naria, Ficus. Par hydrolyse, il se décompose en libérant de l'acide d-mannuronique ; ce dernier n'a pas été décelé dans d'autres plantes (1).

Probablement l'acide alginique est un analogue de l'acide pectique, où les restes de l'acide d-mannuronique sont liés par les liaisons β glucosidiques disposées entre le premier atome de carbone et le carbone en position 4 de l'autre reste (2). La solubilité de l'acide alginique dans l'eau est variable suivant le degré de sa polymérisation, au maximum 5 p. 100.

Les alginates alcalins et de magnésium sont solubles dans l'eau. Les acides forts déplacent l'acide des solutions d'alginate de sodium. Cette précipitation débute à pH 4 et est totale à pH 2,5 (3).

B. — Recherches antérieures sur la clarification des vins à l'aide de l'acide alginique.

En 1939, KOULJINSKAYA (4) a effectué les premiers essais sur la mise au point d'un procédé de clarification des vins réfractaires aux techniques habituelles, comme les vins atteints de troubles protéiques ou élaborés à partir des moûts obtenus au moyen des pressoirs continus ainsi que les hydromels, les cidres, les vins de prunes. Les alginates et les zoostérates employés en combinaison avec la gélatine ont donné des résultats intéressants.

L'utilisation des alginates a été expérimentée avec succès par POPOVA (5) sur les hydromels et ensuite par KOULJINSKAYA (6) sur les vins de différents types. Pour cet œnologue, les alginates, produits moins chers, sont susceptibles de remplacer le tanin, surtout dans le cas des vins blancs. En effet, l'emploi du tanin au cours de la clarification détériore les qualités gustatives de ces vins. KOULJINSKAYA signale tout particulièrement les propriétés de l'acide alginique d'éliminer les substances azotées, l'excès des métaux lourds (fer, cuivre) sous forme de précipités insolubles.

L'expérimentation industrielle comparative sur les différents vins a été effectuée par GVELESSIANI (7 *a*). Ces essais ont montré que le traitement à l'alginate ne modifie pas le pH, les teneurs en acidité volatile, en alcool, en sucre et en tanin. L'acidité totale varie quelque peu. Cette modification s'explique par la dissociation de l'alginate de sodium : l'ion de sodium diminue l'acidité du vin et l'acide alginique colloïdal réagit avec les substances protéiques et avec le fer.

La présence du tanin contrarie le traitement : les vins mousseux, les vins blancs se clarifient mieux que les vins rouges.

En 1953 GVELESSIANI (7 *b*) a conclu que l'alginate de sodium ne peut jouer le rôle de clarifiant universel, puisque pour la formation et la précipitation de l'acide alginique l'acidité élevée des vins constitue une condition indispensable.

Ce produit peut être recommandé pour la clarification des vins mousseux, des vins blancs supérieurs, des vins de fruits et de baies, possédant une acidité élevée (7 p. 100 et plus en acide tartrique) et une teneur peu élevée en tanin (de l'ordre de 250 mg par litre).

Nous avons reproduit dans le tableau I quelques résultats concernant les vins blancs cités dans la première publication de GVELESSIANI (*op. cit.* 7 *a*).

TABLEAU I

Essais		pH	Alcool % vol	Acidité totale % en ac. tartrique	Sucre %	Fer mg/l.	Azote protéique mg/l.	Tanin g/litre
Vin	Clarifiant							
Mousseux	Colle de poisson.....	3,2	10,8	7,2	0,14	17,8	63,0	0,20
	Alginate	3,22	10,8	7,0	0,14	13,0	59,0	0,22
Blanc supérieur	Colle de poisson.....	3,3	11,8	6,17	0,095	22,0	84,0	0,23
	Alginate	3,4	11,8	6,0	0,095	18,0	79,0	0,25

La supériorité de l'alginate par rapport à la colle de poisson au point de vue de l'élimination du fer apparaît nettement. Malheureusement la comparaison n'est pas complète puisqu'il nous manque des données analytiques relatives au vin témoin.

Ces constatations nous ont incité à vérifier sur quelques vins blancs de la région languedocienne, accidentellement enrichis en fer, si l'acide alginique employé seul est susceptible de jouer dans ces cas le rôle d'un déferrisant effectif.

C. — Essais sur le pouvoir déferrisant de l'acide alginique.

L'expérimentation sur le pouvoir déferrisant de l'acide alginique a été effectuée sur deux vins blancs et sur un Vin Doux Naturel Muscat, exceptionnellement riches en fer. L'augmentation excessive de la teneur en ce métal dans ces vins, habituellement de l'ordre de quelques milligrammes par litre, est due à leur séjour dans les cuves en ciment à revêtement intérieur défectueux.

En même temps, l'efficacité du traitement à l'alginate a été comparée à celle de la clarification habituelle comprenant le tanisage et le collage à la gélatine.

Nous avons utilisé l'alginate de sodium pur en poudre livré par la Société PROLABO.

La solubilisation de ce sel dans les vins se faisait suivant les indications de GVELESSIANI (*op. cit.* (7 *a*)). Le procédé de dissolution préconisé par KOULJINSKAYA (*op. cit.* (6 *c*)) a l'inconvénient d'utiliser le vin neutralisé au carbonate de calcium jusqu'à pH 7-7,5 ce qui, d'ailleurs,

permet d'obtenir une solution plus concentrée, 1 p. 100, au maximum.

Une quantité pesée d'alginate de sodium est triturée dans un mortier en porcelaine avec une petite quantité de vin. Après quelques heures de repos, l'alginate se transforme en gel. A ce moment on y ajoute, par portions et en agitant, le volume nécessaire de vin pour obtenir la concentration de 0,5 p. 100. On fait passer la solution colloïdale obtenue à travers un tamis. Avant l'emploi, cette concentration est amenée à 0,25 p. 100 par dilution avec du vin.

A l'aide d'une pipette on additionne des volumes croissants de la solution d'alginate bien agitée dans une série de volumes, toujours les mêmes de vin expérimenté. On mélange tout et on laisse au repos pendant 24 heures. En général, 3 g-6 g d'alginate par 100 litres sont suffisants.

Dans nos essais les volumes de solution d'alginate s'étalaient entre 2 ml et 15 ml, chaque addition séparée étant rapportée au volume de 100 ml de vin. En ce qui concerne le tanisage et le collage, ils s'effectuaient suivant les techniques habituelles.

Notre expérimentation ne comportait pas des essais sur l'emploi combiné d'alginate de sodium et de gélatine suivant les recommandations de KOULJINSKAYA (*op. cit.* (6 *b*)).

Les analyses des vins avant et après les traitements ont été faites suivant les méthodes courantes. En particulier, le pH a été déterminé par la potentiométrie ; pour les dosages du fer et de l'anion phosphorique on a fait appel aux procédés précis mis au point dans notre Établissement (8), (9).

Les caractéristiques analytiques des vins blancs expérimentés sont consignées dans le tableau II.

TABLEAU II

Caractéristiques des vins expérimentés avant les traitements.

Vin	pH	Alcool g/l	Sucre g/l	Acidité en H_2SO_4 g/l.		Fer total mg/l.	PO_4 total mg/l.	Tenue à l'air
				Volatile	Totale			
Vin blanc n° 1.....	3,2	11	—	0,34	3,55	189	111	Casse
Vin blanc n° 2.....	3,18	11	—	0,40	3,70	161	118	Casse
Vin doux naturel Muscat.....	3,78	15	126	0,24	2,90	97	667	Casse

Comme on le voit, tous ces vins contenaient des quantités élevées de fer et étaient atteints de troubles ferriphosphatiques.

Les résultats analytiques obtenus après les essais comparatifs des traitements avec l'alginate et avec le tanin et la gélatine sont réunis dans le tableau III.

Il ressort de l'examen des données du tableau que dans le cas des vins expérimentés l'efficacité de l'acide alginique a été nulle, ce qui peut s'expliquer par l'insuffisance de l'acidité totale de ces vins en conformité avec les conclusions de GVELESSIANI (*op. cit.* (7-*b*)). Par contre, le collage habituel a réussi, sans enrayer la casse, de diminuer sensiblement les teneurs en fer des deux vins blancs (34 et 52 p. 100 de fer éliminé). Ce même traitement a été efficace pour le Vin Doux Naturel Muscat.

TABLEAU III

Vin, nature, provenance	Fer teneur initiale mg/l	Traitement à l'alginate		Traitement au tanin et à la gélatine (mg/litre).					
		Fer restant	Tenue à	Tanin 25 Gélatine 50		Tanin 50 Gélatine 50		Tanin 5 Gélatine 100	
				Fer restant mg/l	Tenue à l'air	Fer restant mg/l	Tenue à l'air	Fer restant mg/l	Tenue à l'air
Vin blanc n° 1 (Aude)..	189	189	Casse	127	Casse	127	Casse	127	Casse
Vin blanc n° 2 (Aude)..	161	161	Casse	87	Casse	87	Casse	87	Casse
Vin doux naturel Muscat (Pyr. Or.)...	97	97	Casse	—	Limp.	—	—	—	—

D'autres essais avec l'alginate de sodium dit alimentaire sur les vins blancs d'autres origines ont confirmé récemment nos premières conclusions.

Le comportement de l'acide alginique, substance colloïdale, dans les vins en qualité de déferrisant pourrait être compris mieux, si l'on tenait davantage compte des colloïdes présents dans ces liquides. En effet, le vin constitue un système hétérogène polyphasique des substances colloïdales diversement dispersées dans une solution hydroalcoolique des électrolytes.

Or, cette boisson n'est pas suffisamment connue au point de vue de ses propriétés colloïdales, de l'importance des rapports entre ses colloïdes et ses électrolytes.

Cette remarque est aussi valable en ce qui concerne les phénomènes ayant lieu au cours des opérations de clarification des vins. C'est pour cette raison que LENCHINE (10) indique que la quantité d'un clarifiant à introduire se trouve en relation directe avec la teneur en colloïdes totaux.

Un certain nombre d'enseignements et de résultats concernant les colloïdes des vins et des jus de raisin se trouve cité dans nos publications (11), (12).

Fait intéressant, l'état colloïdal de différentes substances contenues dans les vins détermine les états variés du fer. D'après BÖHRINGER et SCHMOLE (13), le fer s'y trouve d'une part, en combinaison avec les col-

loïdes par l'effet d'absorption et, d'autre part, sous forme non combinée, comme fer intermicellaire. Sous forme colloïdale, surtout aux pH élevés, le fer s'échappe aux réactifs tels que le ferrocyanure ou aux échangeurs d'ions de type neutre.

Il est fort possible que l'acide alginique soit susceptible de réagir avec le fer lié aux colloïdes. Cette circonstance expliquerait son action sélective en fonction de la constitution colloïdale des vins.

De toute façon, les phénomènes colloïdaux dans les vins mériteraient des recherches approfondies plus systématiques.

III. — CONCLUSION

Les essais sur l'utilisation de l'acide alginique pour la déferrisation des vins peu acides ont montré l'inefficacité de ce produit même en présence des teneurs élevées en fer.

De ce fait, l'acide alginique employé seul ne peut être considéré comme agent déferrisant universel en conformité avec les constatations antérieures.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Bell (D.). — Mono and oligosaccharides and acidic monosaccharide derivatives dans Peach (K.), Tracey (M.). — *Moderne methoden der Pflanzenanalyse*, **2**, 47, 1955. — Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer Verlag.

(2) Kretovitch (V.). — Principes de la biochimie des plantes (Titre trad.), 104, 1952. Moscou.

(3) Perrin (M.). — Les produits des algues. *Ch. & Ind.*, **74**, n° 2, 243, 1955.

(4) Kouljinskaya (N.). — Nouveaux clarifiants pour les vins de fruits et de baies (Titre trad.) *Troudy C. N. I. E. A (Travaux de S. N. I. E. A.). Rosglavvino*, n° 1, 1941.

(5) Popova (E.). — Faits nouveaux dans la technologie des hydromels (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo* (Œnologie et Viticulture). S. S. S. R., n° 3, 1948.

(6) Koljinskaya (N.). — *a*) Clarification des vins à l'aide de l'alginate de sodium (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo* , S. S. S. R., n° 5,30, 1951. — *b*) Sur la séparation des substances azotées dans le vin (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 9, 11, 1951. — *c*) Expériences sur la clarification du vin à l'aide de l'alginate de sodium (Titre trad.). *Ibidem*, n° 11, 23, 1951.

(7) Gvelessiani (V.). — *a*) Expérimentation avec l'alginate de sodium dans les conditions industrielles (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, S. S. S. R., n° 11, 24, 1951. — *b*) Mécanisme de la clarification des vins à l'aide de l'alginate de sodium (Titre trad.). *Ibidem*, n° 9, 18, 1953.

(8) Deibner (L.), Bouzigues (H.). — *a*) Dosage électrophotométrique des traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Techn. Agric.*, I. N. R. A., **1**, 283, 1952. — *b*) Procédé rapide de traitement oxydatif des vins secs ou sucrés par voie humide à l'aide du peroxyde d'hydrogène. Son application au dosage électrophotométrique de traces de fer à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. Tech. Agric.*, I. N. R. A., **2**, 389, 1953. — *c*) Dosage de traces de fer total dans les vins. *Mikrochimica Acta*, n° 5, 501, 1954.

(9) DEIBNER (L.), BOUZIGUES (H.). — Dosage de l'anion orthophosphorique dans les vins par le procédé électrophotométrique au bleu phosphomolybdique. *Ann. Tech. Agric.* I. N. R. A., **4**, 309, 1955.

(10) LENCHINE (A.). — Collage des vins de pommes (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*. S. S. S. R., nº 9, 19, 1953.

(11) DEIBNER (L.), RIFAÏ (H.), FLANZY (M.). — Substances colloïdales des jus de raisin. Influence de différents modes de conservation sur leur stabilité. *Annales Tech. Agric.*, I. N. R. A., **7**, 5, nº 1, 1958.

(12) DEIBNER (L.). — Quelques aspects du problème de la prévision des précipitations ferriphosphatiques dans les vins. *Revue Ferm. et Ind. Alim.*, Belgique , **11**, nº 6, 311, 1957 et suite.

(13) BÖHRINGER (P.), SCHMOLL (G.). — Der Eisengehalt des Weines und seine Beziehung zu den Weincolloïden, *Die Deutsche Weinbau, Wissenschaftliche Beihefte*, nº 11, 20, 64, 1953.

INFLUENCE DU MODE D'ALCOOLISATION ET DE LA NATURE DES ALCOOLS SUR LA QUALITÉ DES VINS DOUX NATURELS

PAR

P. BÉNARD, P. ANDRÉ et L. DEIBNER

Station Centrale de Technologie de Produits Végétaux, Narbonne (Aude).

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Travaux antérieurs.

III. — Recherches personnelles.

IV. — Conclusion.

Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Les Vins Doux Naturels, dénommés ainsi en raison de leur régime fiscal particulier, appartiennent à la catégorie des vins spiritueux doux suivant la classification des vins spéciaux adoptée par l'Office International du Vin (1).

Les Vins Doux Naturels sont obtenus par fermentation des moûts des raisins de Grenache, de Muscat, de Macabéo, de Malvoisie, seuls ou en mélange, possédant obligatoirement une richesse en sucre égale à 252 g par litre ou à 14° d'alcool en puissance et dans lesquels a été fait un apport de 5 p. 100 à 10 p. 100 d'alcool pur titrant au moins 90°.

Les conditions de l'addition d'alcool de surforce, ainsi que sa provenance, son degré ont une influence déterminante sur les qualités du produit définitif.

Il existe un certain nombre de travaux concernant les particularités de l'élaboration des vins spiritueux doux. Leur rappel succinct constitue l'objet du chapitre suivant.

II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

Les deux aspects distincts du problème de l'alcoolisation des vins spiritueux doux et des Vins Doux Naturels, en particulier, sont la nature de l'alcool utilisé et le mode de son introduction.

A. — Mode d'alcoolisation.

L'addition d'alcool au cours de l'élaboration des Vins Doux Naturels, ayant lieu pendant la fermentation, peut s'effectuer de trois manières. La première manière, habituellement employée, correspond à l'affusion d'alcool sous forme liquide. En général, les meilleurs résultats sont obtenus en ajoutant de l'alcool à deux ou trois reprises (2). Aux mêmes conclusions aboutit M. Flanzy à la suite de travaux poursuivis pendant plusieurs années et non encore publiés. L'alcool ainsi ajouté « régularise la fermentation alcoolique » suivant l'expression de cet auteur.

Tout en admettant la supériorité de l'alcoolisation au cours de la fermentation, Guerassimov (3) signale que dans les conditions de la cave expérimentale de Magaratch en Crimée, l'affusion d'alcool en plusieurs fois n'a aucun avantage par rapport à l'affusion unique.

L'addition d'alcool peut se faire par diffusion, proposée par Prandi en 1924 (4) et plus tard, en 1930, par Prostosserdov (5). Le procédé de Prostosserdov, décrit dans les ouvrages d'œnologie soviétiques (6) (*op. cit.* (3 *a*)), est basé sur l'échange d'alcool et d'eau entre les surfaces du vin et d'alcool, disposés dans une enceinte étanche maintenue à la température de 20-22° C. Ce mode d'alcoolisation est peu pratique en raison de sa durée et des complications techniques.

En 1952 Deibner et Bénard (7) ont proposé un procédé plus simple : l'alcoolisation par distillation d'alcool dans le vin. Les avantages de ce procédé ont été confirmés par d'autres recherches (8), (9).

Presque simultanément Griasnov (10) a mis au point un appareil de laboratoire permettant l'alcoolisation du vin chauffé par des vapeurs alcooliques.

B. — Nature de l'alcool de surforce

Au cours de l'élaboration des Vins Doux Naturels l'opération d'alcoolisation fait appel aux alcools purs titrant au moins 90° Gay-Lussac.

La législation française ne précise pas la nature de l'alcool additionnel. En principe, les alcools rétrocédés par l'État perdent leur origine au sein du Service des Alcools.

La préférence donnée aux alcools de vin rectifiés par des œnologues, tels que Cazalis, Sébastian (11), s'explique, d'après Semichon (12), par la constatation qu'à la longue les vins, préparés avec de très bons alcools rectifiés de vins, s'améliorent toujours ce qui ne l'est pas souvent avec les alcools d'autres provenances. En particulier, Ventre (13) a montré que les Vins Doux Naturels, préparés avec de l'excellent alcool de vin, étaient plus fins et plus bouquetés que ceux obtenus avec de l'alcool d'industrie ou, mieux, de l'alcool d'autre origine. A ce sujet, remarquons que, d'après

Barbet et Arachevesne (14), la classification des alcools commerciaux en alcools naturels et en alcools d'industrie ne correspond pas à la réalité. En effet, tous ces alcools sont naturels puisque leur provenance est liée au même phénomène biologique : la fermentation d'un moût sucré.

D'après Egorov, Kotliarenko et Preobrajensky (15), les vins alcoolisés au moyen d'alcools rectifiés, neutre et extra-neutre, sont meilleurs au point de vue de leurs qualités organoleptiques. L'alcool de vin rectifié, l'eau-de-vie du type Cognac déterminent un bouquet, un goût déformés.

L'emploi des eaux-de-vie pour l'alcoolisation des vins constitue un problème souvent posé et non résolu définitivement.

La préférence accordée aux alcools neutres, extra-neutres, par rapport aux eaux-de-vie de vin, s'explique par l'absence de la vinosité propre à ces dernières qui ne s'harmonisent pas toujours aux vins. Par exemple, en cours d'élaboration des vins de liqueur et des mistelles, on emploie de l'alcool neutre qui « se fond » beaucoup plus vite que les alcools concentrés de vin, c'est-à-dire l'alcool titrant de 80° à 95° (*op. cit.* (12) p. 28).

L'utilisation des alcools de vin non rectifiés titrant de 76° à 78° est obligatoire au Portugal pour l'élaboration des vins de Porto. D'après Cincinnato da Costa (16), cette particularité détermine la supériorité de ces vins en raison de la meilleure conservation des parfums, de la rapidité de fusion de l'alcool avec le vin, due à la présence d'eau dans les eaux-de-vie. Ces qualités apparaissent en fonction du temps, car la maturité des vins de Porto se manifeste après six ou huit ans,

En France, les essais comparatifs de l'alcoolisation des Vins Doux Naturels avec de l'alcool rectifié et avec les eaux-de-vie de nature différente (eau-de-vie de marc, de piquette et de vin) ont été effectués à l'échelle semi-industrielle et au laboratoire par Got (17).

L'eau-de-vie de marc et l'eau-de-vie de piquette communiquent au vin un goût et un arôme désagréables. Par contre, l'eau-de-vie de vin jeune permet d'obtenir un relèvement net et considérable de la qualité par rapport à l'alcool extra-neutre. Les vins à base d'eau-de-vie de vin sont plus fins et plus bouquetés.

Une amélioration certaine a été également obtenue avec l'alcoolisation combinée, comprenant l'emploi de l'alcool rectifié (5 à 7 p. 100) et de l'eau-de-vie de vin (3 à 5 p. 100). Pour les Vins Doux Naturels, la loi autorise les opérations dites de « surmutage » permettant d'affiner les vins une fois terminés avec des eaux-de-vie fines provenant, en général, de l'Armagnac, du Cognac ou du Languedoc, sans que la limite maximum de mutage puisse être dépassée.

Got signale que l'eau-de-vie vieille domine toujours dans le produit fini ; en outre, les eaux-de-vie de Cognac et d'Armagnac essayées dans des surmutages à 0,5 p. 100 ont donné des Vins Doux Naturels à caractères

rappelant trop l'origine de l'eau-de-vie utilisée. Il ressort de ces essais qu'il est préférable d'employer l'eau-de-vie de vin jeune, de bonne qualité provenant de vins de pays sains et sélectionnés.

Le problème d'utilisation de différentes eaux-de-vie de vin comparativement à celle des alcools rectifiés ne pouvait être considéré comme définitivement résolu tant que l'expérimentation comprenant l'emploi des différents modes d'alcoolisation, en phase liquide et en phase vapeur, n'eut pas été réalisée.

En procédant à de tels essais, nous avons cherché à combler, tout au moins partiellement, cette lacune.

III. — RECHERCHES PERSONNELLES

Des recherches correspondantes ont été entreprises par nous en septembre 1952 sur un Vin Doux Naturel obtenu à partir du jus de Grenache rouge en provenance de Tautavel (P. O.) vinifié en rose, sans emploi d'anhydride sulfureux. L'addition d'alcool a été effectuée, d'une part, suivant le procédé habituel en trois fois, et, d'autre part, par distillation d'alcool dans le vin suivant la technique de DEIBNER et BÉNARD (*op. cit.* (7)).

Pour ces essais nous avons utilisé de l'alcool de vin rectifié et un certain nombre d'eaux-de-vie bien définis. Les caractéristiques de ces solutions alcooliques sont données dans le tableau I.

TABLEAU I

Désignation	Nature	Degré	Année	Observations
I	Alcool de vin rectifié.	90	—	Obtenu par distillation des vins rouges de consommation courante dans l'appareil de laboratoire Barbet et rectifié à l'aide d'une colonne Robert.
II	Eau-de-Vie d'Armagnac.	52,1	1951	Région du Bas-Armagnac. Distillé en novembre 1951. Prélevé le 4 janvier 1952 par M. Canal.
III	Cognac.	68	1951	Remis par M. P. Couillaud. Station Viticole de Cognac.
IV	Eau-de-Vie du Languedoc.	64,8	1951	Provenance : Narbonne.
V	Eau-de-Vie des Corbières.	46,7	—	Obtenue à partir d'un vin vieux rancio (Grenache). (Appareil distillatoire de laboratoire Barbet, août 1952).
VI	Eau-de-Vie ordinaire.	54	—	Obtenue à partir d'un vin de Coursan (Aude) de 9°, récolte 1951 (appareil distillatoire de laboratoire Barbet, août 1952).

Toutes les eaux-de-vie expérimentées, sauf celle des Corbières, étaient jeunes ; aucune n'a subi la maturation dans les futs de chêne.

Deux séries d'essais, désignées par les lettres A (affusion habituelle) et D (distillation), comprenant chacune 6 échantillons, ont été effectuées. Chaque échantillon de vin de 3 1/2 litres environ, contenues dans les bouteilles en verre, était marqué, en plus de la lettre de la série, par un chiffre romain correspondant à la solution alcoolique employée.

Les vins obtenus ont été soutirés par siphonage dans les bouteilles en verre suivant la technique habituelle en novembre 1952 et en juin 1955.

Les résultats de l'analyse de ces vins, effectuée au mois de novembre 1956, sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Mode d'alcoolisation :
— Série A par affusion,
— Série D par distillation.

Désignation du vin	Alcool employé	Densité à 15°C	Sucre g/l	Degré	Acidité en g/l de H_2SO_4	
					Volatile corrigée	Totale
A-I	Alcool neutre.	1 0365	132,5	17,8	0,39	2,5
A-II	Armagnac.	1 0355	122,0	17,15	0,31	2,4
A-III	Cognac.	1 0388	123,5	16,2	0,31	2,6
A-IV	Eau-de-Vie du Languedoc.	1 0388	140,0	17,55	0,34	2,4
A-V	Eau-de-Vie des Corbières.	1 027	138,5	17,25	0,34	2,5
A-VI	Eau-de-Vie ordinaire.	1 031	112,5	17,25	0,31	2,35
D-I	Alcool neutre.	1 0385	118,5	16,94	0,34	2,70
D-II	Armagnac.	1 0355	121	16,10	0,31	2,70
D-III	Cognac.	1 0395	134	16,80	0,30	2,90
D-IV	Eau-de-Vie du Languedoc.	1 036	120,5	17,10	0,27	2,60
D-V	Eau-de-Vie des Corbières.	1 027	107,0	18,60	0,27	2,70
D-VI	Eau-de-Vie ordinaire.	1 036	125.5	18,74	0,30	2,50

Les données analytiques ont été obtenues au moyen des méthodes suivantes : la densité par densimétrie, le degré alcoolique par la méthode chimique de FLANZY, Mme BOUZIGUES et BOUZIGUES (18), le sucre par la méthode de MOHR-BERTRAND (19), l'acidité volatile d'après le procédé de JAULMES à l'aide de son grand appareil (*op. cit.* (19), p. 390) l'acidité totale suivant la technique de GILLE (20), utilisant le rouge de phénol comme indicateur (*op. cit.* (19), p. 281).

Il ressort de l'examen des résultats du tableau II que les degrés et les teneurs en sucre des vins expérimentés ne sont pas identiques dans l'ensemble et à l'intérieur de chaque série. Les différences constatées sont imputables aux difficultés de l'expérimentation comportant un nombre assez élevé d'échantillons.

Au cours de la maturation des vins obtenus, d'une durée totale de 3 ans et 9 mois, les variations de leurs propriétés organoleptiques ont été suivies au moyen de trois dégustations.

Le premier examen organoleptique effectué le 10 novembre 1953, un an après le premier soutirage, a montré la supériorité des vins de la série « Distillation ».

Les conclusions de cette dégustation ont été les suivantes :

1° Les vins obtenus par alcoolisation à l'aide d'alcool de vin rectifié de 90°, en phase liquide ou en phase vapeur, sont supérieurs aux vins alcoolisés dans les mêmes conditions par les différentes eaux-de-vie.

2° Aucune différence organoleptique entre les deux procédés lors de l'utilisation d'une eau-de-vie des Corbières.

3° Dans le cas de l'Armagnac, l'addition d'alcool en phase vapeur donne des vins plus fruités, mais moins bons que les précédents.

4° Les vins obtenus avec le Cognac, utilisé en phase vapeur, sont inférieurs à ceux alcoolisés avec de l'Armagnac, mais supérieurs aux vins additionnés d'eau-de-vie du Languedoc.

Le tableau III présente le classement général moyen des vins établi au cours de la première dégustation.

TABLEAU III

Dégustation du 10 novembre 1953
Classement général.

Vin	Note générale	Classement
D I	16	1
A I	15,5	2
D V	15	3
A V	15	3
D II	14	5
D VI	13,5	6
A II	13,0	7
A VI	13,0	7
D III	12,5	9
D IV	12	10
A IV	12	10
A III	12	10

On remarquera que les vins additionnés de l'eau-de-vie des Corbières vieillie ont été reconnus supérieurs à ceux alcoolisés au moyen des eaux-de-vie jeunes du Languedoc et ordinaire.

Au bout de 19 mois après la première dégustation, c'est-à-dire après 2 ans et 7 mois de maturation dans les conditions de laboratoire, a eu lieu le deuxième examen organoleptique. Si cette fois les trois dégustateurs ont encore reconnu la supériorité du procédé de distillation, comme mode d'alcoolisation, leurs avis ont été partagés en ce qui concerne l'influence des eaux-de-vie utilisées sur les propriétés organoleptiques des vins.

Tableau IV-A

Résultats de la dégustation du 17 juin 1955.

N° 1				N° 2				N° 3			
Vin	Note s/20	Classement	Observations	Vin	Note s/20	Classement	Observations	Vin	Note s/20	Classement	Observations
D I.....	16	2	Fruité, léger rancio.	D I.....	15,5	2	Rancio.	D I.....	14,5	4	Rancio, goût léger d'alcool.
D II	16,5	1	Bon, très fin, goût d'eau-de-vie.	D II	16	1	Souple, goût d'eau-de-vie.	D II	13,5	5	Fruité, goût d'alcool, amer.
D III ...	15	3	Bon, goût d'eau-de-vie prononcé.	D III ...	13	6		D III ...	15	3	Bon, goût d'alcool.
D IV ...	14	4	Goût d'alcool, goût de bonbons anglais.	D IV ...	14	4	Goût de raisin.	D IV ...	16	2	Bon, pointe d'amertume.
D V.....	13	5	Goût d'alcool.	D V	15	3		D V	17	1	Bon.
D VI ...	11	6	Mauvais goût.	D VI ...	13,5	5	Goût d'alcool.	D VI ...	12	6	Goût de fruit sûr.
A I.....	13	1	Goût d'alcool.	A I.....	12,5	1	Pas bon, goût d'alcool.	A I.....	12	1	Goût d'alcool.
A II	12	2	Goût d'eau-de-vie.	A II	11,0	3	Goût d'eau-de-vie.	A II	11	3	Goût d'alcool, plus mauvais que A I.
A III ...	11	3	Goût d'Armagnac.	A III ...	11,5	2	Goût d'eau-de-vie, âpre.	A III ..	11,5	2	Astringent, goût eau-de-vie cerises. de
A IV ...	12	2	Goût d'eau-de-vie de fruit.	A IV ...	11	3	Goût de raisin.	A IV ...	9	4	
A V	10	4	Goût d'alcool.	A V	10	4	Goût éthéré, brûlant.	A V	9	4	Goût d'alcool éthéré.
A VI ...	9	5		A VI ...	10	5	Goût de raisin.	A VI ...	9	4	

Les tableaux IV A et IV B résument les résultats de la deuxième dégustation effectuée le 17 juin 1955.

TABLEAU IV-B

Dégustation du 17 juin 1955
Classement général.

N° 1		N° 2		N° 3	
Vin	Classement	Vin	Classement	Vin	Classement
D II	1	D II	1	D V	1
D I	2	D I	2	D IV	2
D III	3	D V	3	D III	3
D IV	4	D IV	4	D I	4
D V	5	D VI	5	D II	5
A I	5	D III	6	D VI	6
A II	6	A I	7	A I	6
A IV	6	A III	8	A III	7
D VI	7	A II	9	A II	8
A III	7	A IV	9	A IV	9
A V	8	A V	10	A V	9
A VI	9	A VI	10	A VI	9

La majorité des conclusions accorde les premières places aux vins alcoolisés avec de l'eau-de-vie d'Armagnac et avec de l'alcool de vin à 90°, l'eau-de-vie de Cognac occupant la troisième position suivie par l'eau-de-vie du Languedoc.

D'une façon générale, les eaux-de-vie jeunes se sont montrées les meilleures.

Après le soutirage dans les bouteilles plus petites et après un repos de 13 mois, les vins ont été de nouveau dégustés. Les résultats du troisième examen organoleptique, effectué le 13 juillet 1956, ont permis de tirer les conclusions suivantes déjà signalées dans notre publication précédente (21) :

1° Les vins élaborés à l'aide d'alcool neutre sont nettement supérieurs.

2° L'alcoolisation par distillation produit des vins surclassant ceux obtenus par affusion habituelle en phase liquide.

L'alcool de vin rectifié, les eaux-de-vie d'Armagnac et de Cognac produisent les vins se mettant en tête du classement.

3° Parmi les eaux-de-vie, celle d'Armagnac, surtout introduite par distillation, permet d'obtenir de bons vins ; l'eau-de-vie de Cognac donne naissance aux vins moins bons par rapport aux précédents en raison du gout d'eau-de-vie originelle. Quant à l'eau-de-vie du Languedoc, elle produit comparativement des vins moins agréables ; toutefois, l'alcoolisation par distillation est susceptible de les améliorer.

4° D'autres eaux-de-vie n'ont pas permis d'obtenir des résultats intéressants.

Soulignons pour terminer la supériorité du procédé d'alcoolisation par distillation et l'influence améliorante des eaux-de-vie jeunes.

Les résultats détaillés de dégustation effectuée par les trois dégustations sont consignés dans le tableau V.

Notre publication précédente (*op. cit.* (21)) a signalé l'effet bonificateur produit par les eaux-de-vie en présence de l'air. Afin de mettre en évidence cet effet, lié vraisemblablement aux phénomènes oxydoréducteurs, nous avons laissé les vins dans les bouteilles bouchées et remplies aux deux tiers pendant plusieurs semaines.

Au mois de janvier 1957, l'examen organoleptique de ces vins a permis de constater une nette amélioration des vins alcoolisés à l'aide des eaux-de-vie d'Armagnac, de Cognac, du Languedoc. Par contre, les vins additionnés d'alcool de vin rectifié supportent moins bien l'influence de l'oxydation même restreinte.

Les résultats de dégustation des vins plus ou moins oxydés sont consignés dans les tableaux VI-A et VI-B.

En présence de ces constatations on est amené à se demander si l'utilisation des eaux-de-vie jeunes en vue de la bonification des propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels n'était pas liée aux soutirages plus fréquents, mais aussi, sans doute, ménagés. A juger d'après les résultats de l'examen organoleptique, même dans ce cas-là l'alcoolisation par distillation conserve son influence améliorante.

A propos de ce mode d'addition d'alcool nos essais complémentaires effectués pour augmenter son efficacité ont montré l'utilité de réception des vapeurs alcooliques dans le vin non refroidi.

Ces essais ont été menés parallèlement à l'expérimentation principale. Le même Vin Doux Naturel a été alcoolisé au moyen d'eau-de-vie du Languedoc par quatre manières différentes :

a) Par affusion habituelle en trois fois.

b) Par distillation suivant trois variantes comprenant :

1° Le refroidissement du vin à + 19° + 20°C.

2° En laissant monter sa température à + 45°C.

3° En effectuant la distillation d'alcool en deux fois dans le vin refroidi.

Les vins obtenus au mois de septembre 1952 ont subi les mêmes opérations que les vins de l'expérimentation principale. Leur dégustation comparative a été effectuée le 23 janvier 1957, c'est-à-dire au bout de 4 ans et 2 mois de maturation.

Les résultats de l'examen organoleptique, consignés dans le tableau VII, ont permis de faire les conclusions suivantes, en tenant compte de l'avis de chaque dégustateur :

1° Les vins alcoolisés par distillation sont nettement supérieurs à ceux obtenus par affusion habituelle.

Tableau V

Résultats de dégustation du 13 juillet 1956.

N° 1			N° 2			N° 3		
Classement		Observations	Classement		Observations	Classement		Observations
Ordre	Vin		Ordre	Vin		Ordre	Vin	
1	D I	Bon, souple, agréable.	1	D I	Bon, souple, agréable.	1	D I	Bon, meilleur de tous.
2	A I	Bon, souple, plus rude.	2	A I	Moins harmonieux.	2	A I	Goût d'alcool.
3	D II	Léger goût d'eau-de-vie, agréable.	2	D II	Agréable, léger goût d'alcool.	3	D II.	Souple.
4	D III	dem.	3	D III	Agréable, goût d'alcool.	4	A II	Moins souple que D II
5	A II	Goût d'alcool plus prononcé.	4	A II	Agréable, souple.	5	D III	Souple.
6	A III		5	A III	Comme D III.	6	A III	Moins souple que D III.
7	D IV	Goût d'alcool.	6	A IV	Bon.	7	A IV	Pas agréable.
7	A IV	Goût d'alcool plus prononcé.	7	D IV	Amer.	8	D IV	Goût de savon, pas bon.
	A V		8	A VI		9	D V	Pas bon.
	D V	Non classés.	8	D VI	Apre, moins bon que A VI.	10	A V	Moins bon que D V.
	A VI		9	A V	Amer.	11	D VI	Pas bon.
	D VI		9	D V		12	A VI	Idem, goût désagréable.

2° Le vin élaboré sans refroidissement a paru plus coulant, plus souple et agréable.

3° La distillation en deux fois avec refroidissement a produit un vin comparable à celui obtenu par simple distillation.

Tableau VI-A

Dégustation du 22 janvier 1957. Classement par série.

N° 1

Série A			Série D		
Vin n°	Classement	Observations	Vin n°	Classement	Observations
I	2	Bouquet, goût agréables.	I	2	Bouquet prononcé, agréable.
II.....	1	Bouquet plus léger que I ; agréable, souple.	II.....	1	Bouquet, force alcoolique prononcée.
III	1	Bouquet d'eau-de-vie prononcé; agréable.	III	1	Idem.
IV	3	Rancio, bouquet agréable, goût de bonbons anglais.	IV	3	Goût de bonbons anglais.
V	4	Fade.	V	4	Bon.
VI	4	Goût de bois.	VI	5	Léger goût étranger ; force alcoolique prononcée.

N° 2

Série A			Série D		
Vin n°	Classement	Observations	Vin n°	Classement	Observations
I	2	Bonne odeur ; harmonieux.	I	2	Caramel.
II.....	1	Plus sec, plus nerveux que I, parfumé.	II.....	1	Léger, fruité odeur d'eau-de-vie.
III	3	Saveur, odeur d'eau de-vie.	III	1	Bien plein ; odeur d'eau-de-vie.
IV	4	Odeur d'eau-de-vie.	IV	3	Trop parfumé.
V	6	Odeur d'eau-de-vie et d'aldéhyde; amer.	V	4	Moins parfumé que IV, neutre. Force alcoolique prononcée.
VI	5	Odeur d'eau-de-vie, neutre, pointe d'amertume.	VI	2	

Signalons que l'effet favorable du réchauffement du vin au cours de la distillation de l'eau-de-vie a été constaté en deux reprises pen-

Tableau VI-B

Dégustation du 22 janvier 1957. Classement général.

N° 1			N° 2			N° 3		
N°	Classement	Observations	N°	Classement	Observations	N°	Classement	Observations
D III ...	1		A II	1		D II	1	
D II	2		A IV ...	1		A II	2	Plus plat que D II.
D I.....	3		D IV ...	2		D I.....	2	
A III ...	4		D II	3		A I.....	3	Goût de raisin, plus parfumé que D I.
A II	4		D III ...	3		D III ...	4	
D V	5		D V	3		A III ...	5	
A VI ...	5		A V	3		A IV ...		
D V	6		D I.....	4		D IV ...		
D IV ...	—	Nuances dans la différence ne	A III ...	4		A V		Pas de préférence.
A V	—	permettant pas la classification	D VI ...	5		D V		
A IV ...	—	nette.	A I.....	6		A VI ...		
			A VI ...	6		D VI ...		
		N. B. la série D est la meilleure.						

Tableau VII

Alcool : eau-de-vie du Languedoc (1951)
Dégustation : le 23 janvier 1957.

Vin		N° 1		N° 2		N° 3	
n°	Mode d'alcoolisation	Classement	Observations	Classement	Observations	Classement	Observations
A IV ..	Affusion.	4	Plus rude que les suivants.	4	Goût de raisin comme les suivants.	3	Rude ; bouquet plus prononcé.
D IV ..	Distillation						
D IV f.	Vin refroidi	3	Légèrement moins coulant que D IV-c.	2	Bon.	2	Bon.
D IV c.	Vin non refroidi	1	Coulant, agréable.	1	Plus souple que le précédent.	1	Plus souple, plus fondu que A IV.
D IV 2.	Distillation en 2 fois	2	Coulant, agréable.	3	Plus souple que le précédent.	2	Bon.

dant les deux dégustations partielles précédentes comme le montre le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Distillation	Date de dégustation	
—	13-7-55	23-1-57
Avec refroidissement du vin	Goût et arôme d'eau de vie.	Plus bouqueté, moins coulant, goût d'alcoo et de raisin prononcé.
Sans refroidissement du vin	Idem, plus agréable.	Plus souple, plus arrondi, meilleur.

En définitive, il ressort de tous ces essais que si le refroidissement du vin diminue les risques de perte en alcool par évaporation, par contre, il retarderait l'épanouissement des qualités gustatives du vin.

D'une façon générale, l'amélioration des propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels dépend, dans les conditions de nos essais, du mode d'alcoolisation, la distillation donnant des meilleurs résultats. Le rôle de la nature des alcools employés est également important. Notre expérimentation a montré, au bout de presque 4 ans de maturation, la supériorité de l'alcool de vin rectifié par rapport aux différentes eaux-de-vie, malgré le choix délibéré de son degré inférieur à celui habituellement employé, de 96°. Si l'emploi d'une eau-de-vie vieille n'a pas donné de bons résultats, les eaux-de-vie jeunes ne sont pas toutes équivalentes au point de vue de leur influence améliorante. Sans aucun doute, leur composition est responsable de cette inégalité d'action. Cette conclusion est également valable pour les alcools neutres. Dans nos essais, l'effet bonificateur des eaux-de-vie d'Armagnac et de Cognac a été nettement constaté ; même à une certaine époque de la maturation de ces vins, la priorité de l'Armagnac par rapport à l'alcool de vin de 90° pouvait être envisagée. D'ailleurs, il faut reconnaître les difficultés de la dégustation des Vins Doux Naturels expérimentés en raison de leur nombre et de la nécessité de tenir compte du classement par série et du classement général. D'autre part, les résultats obtenus sont valables pour le vin donné et les alcools utilisés.

Malgré ces remarques restrictives, l'étude des variations des propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels au cours de leur maturation prolongée pendant 3 ans et 9 mois a permis de tirer des enseignements utiles susceptibles d'être appliqués à l'échelle semi-industrielle.

IV. — CONCLUSION

L'influence du mode d'alcoolisation et de la nature des alcools additionnels sur l'évolution des propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels au cours de leur maturation a fait l'objet des recherches de longue durée destinées à compléter les conclusions des travaux précédemment publiés.

Commencés en 1952 et terminés en 1956, ces essais ont de nouveau démontré la supériorité du procédé d'alcoolisation par distillation par rapport au procédé d'affusion d'alcool en phase liquide.

Quant au rôle de la nature des alcools, il a été reconnu que l'alcool de vin rectifié produit les vins classés en tête, suivi par les eaux-de-vie d'Armagnac et de Cognac jeunes. Toutefois, l'effet bonificateur des eaux-de-vie pourrait être accentué par l'aération ménagée des vins.

Les résultats de l'expérimentation autorisent à supposer que l'efficacité des alcools additionnels se trouve en relation, non seulement avec leur composition, ce qui implique la nécessité de leur contrôle chimique, mais également avec leur réactivité plus ou moins grande, suceptible de masquer ou, au contraire, de faire mieux ressortir les caractères propres aux Vins Doux Naturels.

Reçu pour publication le 16 *janvier* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Définition du Vin et des Vins spéciaux. 34e Session plénière du Comité de l'Office Intern. du Vin. *Bull. Office Int. Vin*, **27**, n° 284, août, 1954.
(2) Semichon (L.). — L'Œnologie. Dix ans d'efforts scientifiques et industriels 1914-1924, 1926. Paris, Chimie et Industrie, éd.
(3) Guerassimov (M.). — *a*) Technologie de la vinification (Titre traduit), 181, 1952. Moscou. — *b*) Trav. Oenol. choisis de 1925 à 1926 (Titre traduit), 377, 1955. Moscou.
(4) Prandi (O.). — Il vino in ambiente secco ed in ambiente umido. *Staz. Exper. Agr. Ital.*, **57**, 205, 1924.
(5) Prostosserdov (N.). — Vestnik Vinogradarstva i torgovli vina (Messager de la Viticulture et du Commerce du Vin) S. S. S. R., n° 10, 687, 1930.
(6) Frolov-Bagreev (A.), Agabaliantz (G.). — Khimiya vina (*Chimie du Vin*), 140, 1951, Moscou.
(7) Deibner (L.), Bénard (P.). — Nouveau procédé d'alcoolisation des vins spéciaux par diffusion graduelle des vapeurs alcooliques. *Ind. Agr. Alim.*, **69**, n° 12, 881, 1952.
(8) Deibner (L.), Bénard (P.). — Recherches sur la maturation des Vins Doux Naturels. *Ann. Tech. Agric.*, I. N. R. A., **5**, n° 3, 357 et 377, 1956.
(9) Deibner (L.). — Potentiel d'oxydoréduction et ses relations avec les propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels. *Ann. Tech. Agric.*, I. N. R. A., **5**, n° 3, 399, 1956.
(10) Griasnov (V.). — Procédé d'alcoolisation des vins par diffusion (Titre trad.). *Vinodélié i Vinogradarstvo*, n° 5, 14, 1952.
(11 *a*). Cazalis (F.). — Traité pratique de l'art de faire le vin, 137, 1896. Paris, Masson éd.
(11 *b*) Sébastian (V.). — Les vins de luxe, 70, 1897, Montpellier-Paris, Coulet-Masson, éd.
(12) Semichon (L.). — L'industrie de la distillerie et la viticulture. *Revue Vit.*, **62**, 24, 1925.
(13) Ventre (J.). — Traité de vinification pratique et rationnelle, **1**, 396, 1929. Montpellier, Coulet éd.
(14) Barbet (E.), Arachequesne (G.). — Manuel théorique et pratique des fabricants d'alcools et d'eaux-de-vie, 132, 1894. Paris, Bernard éd.

(15) Egorov (A.), Kotliarenko (M.), Preobrajensky (A.). — Amélioration de la qualité des vins de raisins alcoolisés (Titre trad.). — Vinodélié i Vinogradarstvo (*Œnologie et Viticulture*), S. S. S. R., nº 8, 6, 1951.
(16) Cincinnato da Costa (L.). — Le problème des eaux-de-vie et des alcools Influence de leur provenance et de leur degré dans le vinage. Rapport général, Vᵉ Congrès Intern. de la Vigne et du Vin. Lisbonne, **2**, 181, 1938.
(17) Got (N.). — Les Vins Doux Naturels, 81-84, 1947. Perpignan.
(18). Flanzy (M.), Mme Bouziques (L.), Bouzigues (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Tech. Agric.*, I. N. R. A., **4**, 397, 1955.
(19) Jaulmes (P.). — *Analyse des vins*, 176, 1951. Montpellier, Poulain éd.
(20) Gille (R.). — Méthode de dosage de l'acidité dans les milieux colorés, notamment dans les vins. *Ann. Fals. Fraudes*, **25**, 145, 1932.
(21) André (P.), Bénard (P.), Deibner (L.). — Influence du mode d'alcoolisation et de la nature des alcools sur les propriétés organoleptiques des Vins Doux Naturels. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **43**, 161, 1957.

Le Directeur-Gérant: B. Laclavière.

INFLUENCE DU CHAUFFAGE DU LAIT SUR LE DÉVELOPPEMENT DES BACTÉRIES

II. — EFFET STIMULANT DU LAIT AUTOCLAVÉ SUR LA CROISSANCE DE *LACTOBACILLUS LACTIS* RÔLE DE L'ACIDE FORMIQUE

PAR

J. E. AUCLAIR et A. PORTMANN

Station de Microbiologie et Recherches laitières,
Jouy-en-Josas (S-et-O).

INTRODUCTION

Dans un article précédent (1) nous avons montré que la croissance des bactéries lactiques dans le lait chauffé dépend essentiellement des organismes utilisés et du degré de chauffage du lait. Le chauffage du lait à des températures supérieures à 100°C, en particulier, a un effet variable suivant les germes utilisés : tandis que le chauffage du lait à l'autoclave a pour effet de diminuer la croissance de certains germes tels que *Streptococcus agalactiae* 1 B, d'autres micro-organismes tels que *Str. thermophilus* TJ et *Lactobacillus lactis* O 37 se développent mieux dans le lait chauffé à 110-120° C que dans le lait chauffé seulement à 80-90°C.

Cet effet stimulant du lait autoclavé sur certaines bactéries lactiques a déjà été observé par de nombreux auteurs qui l'ont attribué soit à la destruction de substances bactéricides thermostables (2), soit à l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction du lait au cours du chauffage (3), soit à une augmentation de la teneur du lait en azote non protéique résultant d'une hydrolyse de la caséine (4).

Parker et Elliker (5), étudiant la croissance des bactéries lactiques dans un milieu à base de phosphocaséinate de calcium, ont montré que la croissance des bactéries est fonction de la teneur du milieu en azote aminé libre, teneur qui augmente avec la durée de chauffage du milieu à l'autoclave. Ils constatent de plus que l'addition de lactose au milieu de culture avant le chauffage favorise la croissance des bactéries lactiques et spécialement de *Str. thermophilus*.

La plupart des auteurs ont observé d'autre part que, si le chauffage du lait à l'autoclave a en général pour effet d'améliorer la croissance des

bactéries lactiques, ces mêmes bactéries se développent souvent plus difficilement lorsque le lait a subi un chauffage prolongé (2, 4, 5). PARKER et ELLIKER attribuent cette réduction de l'activité des bactéries lactiques dans le lait chauffé à l'autoclave pendant 60 minutes à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose.

Dans les expériences qui vont être décrites, nous avons étudié l'effet du chauffage du lait à l'autoclave sur la croissance de *L. lactis* O 37 en déterminant le rôle des différents constituants du lait dans les phénomènes de stimulation observés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. — Mise en évidence d'une ou plusieurs substances stimulantes dans le lait autoclavé.

La figure 1 rappelle les résultats que nous avons obtenus précédemment en cultivant *L. lactis* O 37 dans des laits chauffés à des températures variables (1). La courbe représente les variations du pH des cultures après 18 heures d'incubation en fonction de la température de chauffage du lait.

La différence d'acidité que l'on peut observer entre les cultures faites dans le lait chauffé à 80-90°C et les cultures en lait autoclavé (110-120°C) correspond bien à une différence de croissance du lactobacille dans ces mêmes laits. En effet si l'on compare la croissance de cet organisme dans des laits chauffés à 90°C et à 120°C, croissance mesurée par numération sur gélose de BRIGGS (6), on constate que le taux de croissance du microorganisme est le même pour les deux sortes de lait mais la croissance totale est nettement supérieure dans le lait autoclavé (fig. 2).

Le fait que *L. lactis* O 37 se développe plus activement dans le lait chauffé à 110-120°C que dans le lait chauffé à 80-90°C (où les lacténines sont cependant détruites) peut être dû soit à la destruction par le chauffage à l'autoclave de substances inhibitrices existant dans le lait chauffé à 80-90°C, soit à l'apparition à la suite du chauffage de substances qui activent le développement du lactobacille. L'expérience suivante montre que seule la seconde hypothèse doit être retenue.

Méthode.

Du lait prélevé aseptiquement sur trois vaches dont les mamelles ont été reconnues précédemment indemnes d'infection microbienne, est mélangé, puis écrémé dans une écrémeuse préalablement stérilisée à l'autoclave. Il est ensuite réparti en tubes de 18 × 180 mm à raison de 10 ml par tube. Une partie de ces tubes est chauffée à 90°C pendant 20 minutes, tandis que les autres sont chauffés 20 minutes à l'auto-

clave à 120°C. Des mélanges en proportions variables $\left(\frac{0}{10}, \frac{1}{9}, \frac{2}{8}, \frac{3}{7}\right.$ etc...$\left.\right)$ de lait autoclavé et de lait chauffé à 90°C sont ensuite préparés dans des tubes qui sont ensemencés à 0,001 p. 100 avec une culture active du lactobacille sur lait tournesolé (culture obtenue à partir d'un fort inoculum (10 p. 100), incubée 4 à 5 heures à 42°C et utilisée juste avant la coagulation du lait lorsque le pH atteint 4,9). Après 18 heures d'incubation à 42°C l'acidité est mesurée dans chacun des tubes de culture à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre.

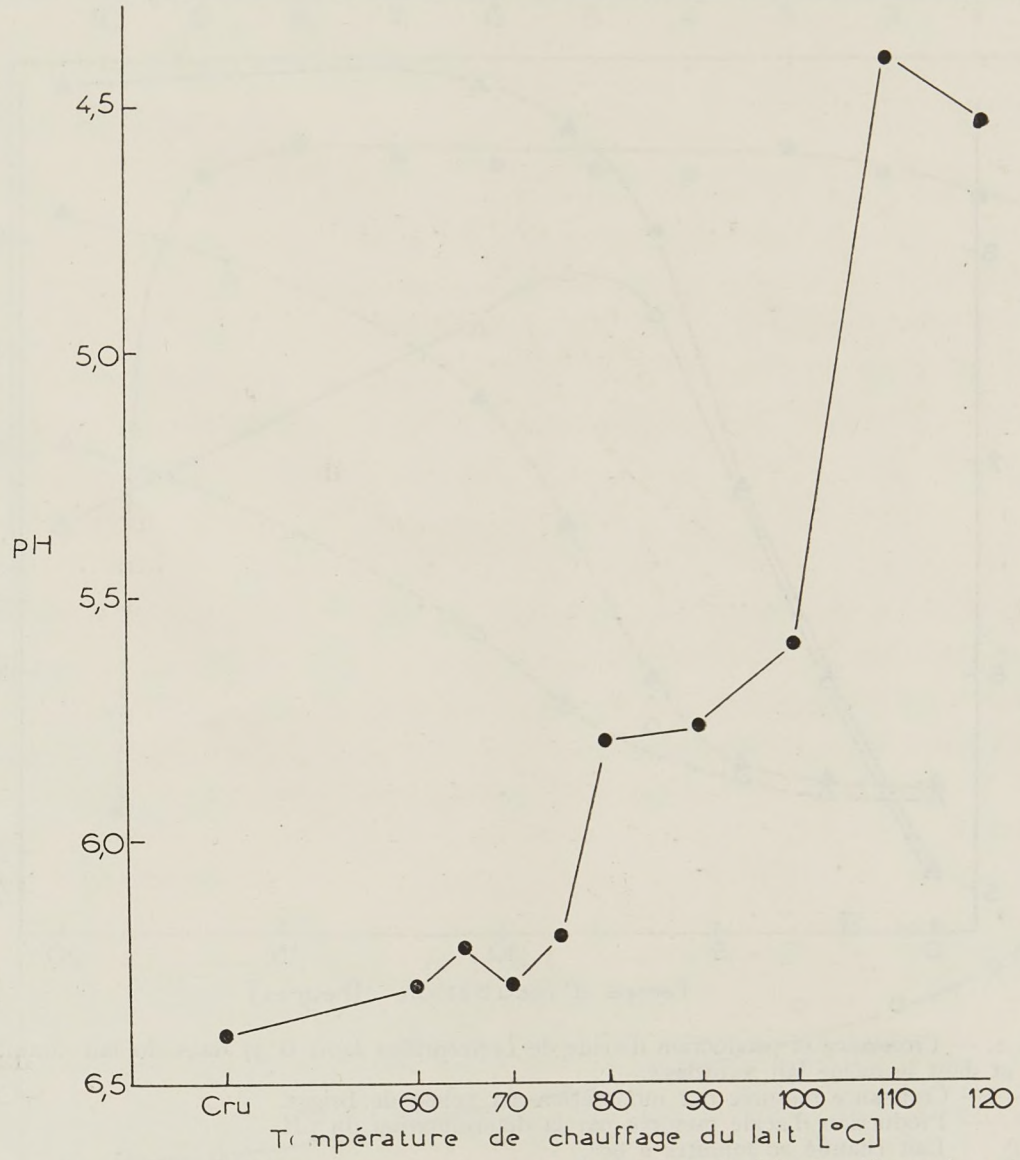


Fig. 1. — Production d'acide par *Lactobacillus lactis O* 37 dans du lait chauffé pendant 20 minutes à différentes températures.
Incubation : 18 heures à 42°.

Résultats.

La figure 3 montre la courbe obtenue en portant en abscisse les proportions de chacun des laits dans les préparations et en ordonnée le pH

atteint après incubation (courbe A), et par comparaison la courbe obtenue avec des mélanges, effectués dans les mêmes conditions, de lait cru et de lait chauffé à 90°C (courbe B).

Si l'on examine tout d'abord la courbe A, on constate que la croissance du lactobacille, relativement faible dans le lait chauffé à 90°C est considérablement améliorée dès que celui-ci est additionné d'une petite

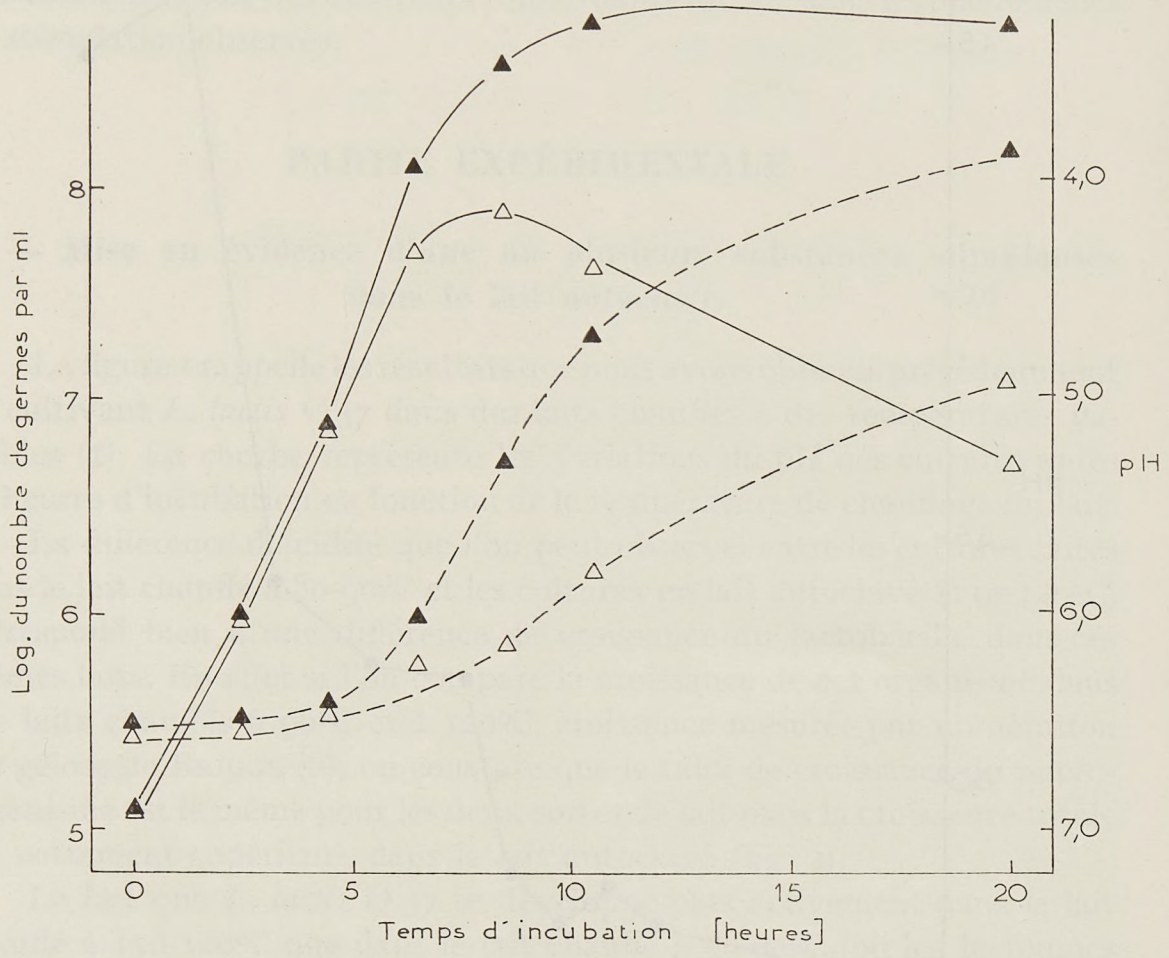


Fig. 2. — Croissance et production d'acide de *Lactobacillus lactis O* 37 dans du lait chauffé à 90° et dans le même lait autoclavé.
———— Croissance mesurée par numération sur gélose de Briggs.
- - - - - - Production d'acide mesurée par la détermination du pH.
△ Lait chauffé 20 minutes à 90°.
▲ Lait autoclavé (20 min. à 120°).

quantité de lait autoclavé. Cela s'explique vraisemblablement par l'existence dans le lait autoclavé d'une substance absente dans le lait chauffé à 90°C et qui, ajoutée à faible concentration à ce lait, stimule fortement la croissance de l'organisme-test.

On peut observer d'autre part sur la courbe A une croissance légèrement plus active du lactobacille dans les mélanges de lait chauffé à 90°C et de lait autoclavé que dans le lait autoclavé seul. Cela montre que le lait autoclavé est probablement déficient en un ou plusieurs facteurs de croissance que contient en plus grande proportion le lait chauffé à 90°C.

La courbe B montre, à titre de comparaison, l'effet d'une substance inhibitrice, la lacténine, sur la croissance du même organisme dans des

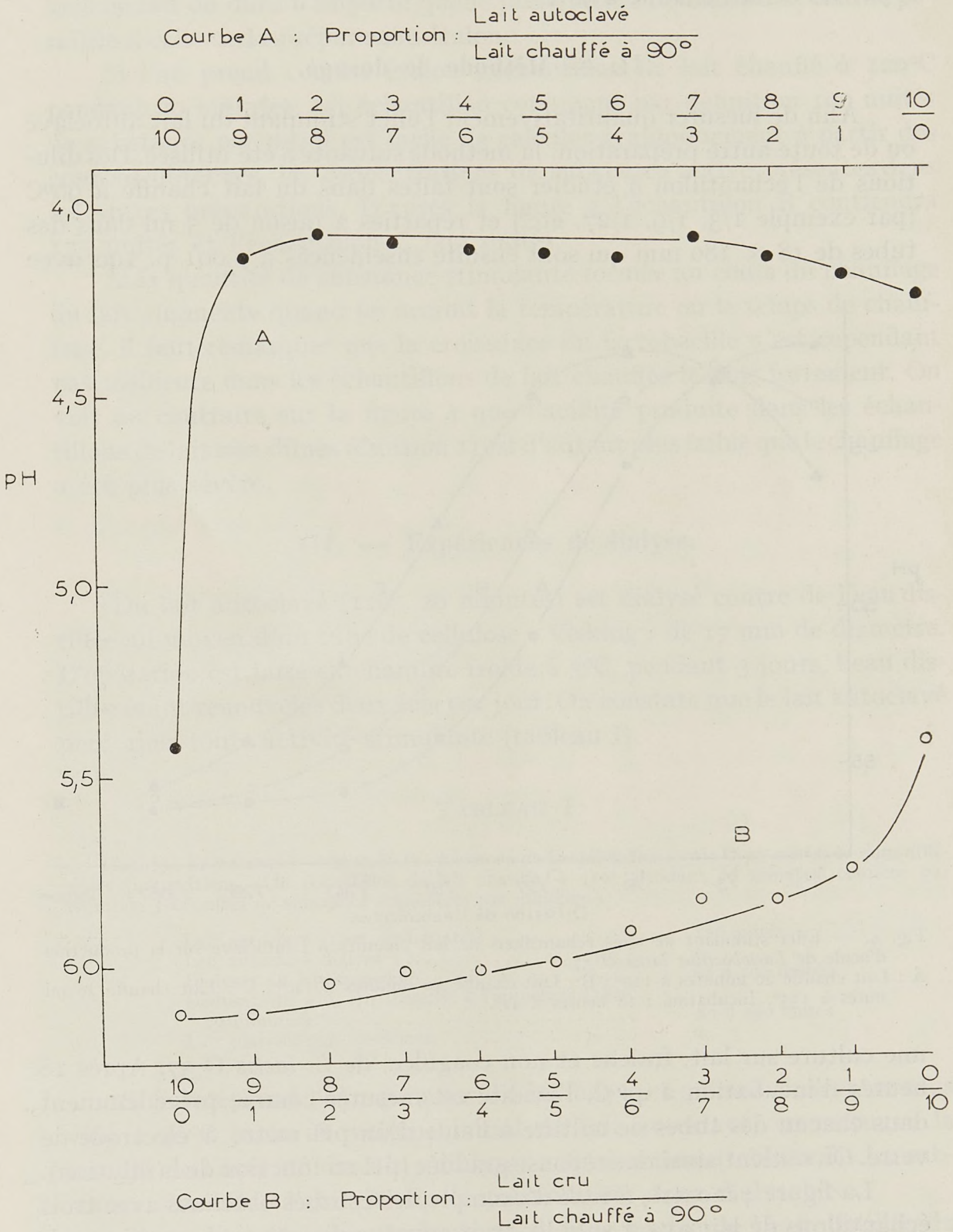


Fig. 3. — Production d'acide de *Lactobacillus lactis O* 37 dans des mélanges en proportions variables de lait autoclavé et de lait chauffé à 90° (courbe A : ●—●) ; de lait cru et de lait chauffé à 90° (courbe B : ○——○).

mélanges de lait cru (contenant la lacténine) et de lait chauffé à 90°C (où la lacténine est détruite). On voit que cet effet inhibiteur se manifeste

dans toutes les préparations contenant du lait cru et que l'inhibition est encore marquée dans le mélange contenant une partie de lait cru pour 9 parties de lait chauffé à 90°C.

II. — Méthode de dosage.

Afin de mesurer quantitativement l'effet stimulant du lait autoclavé ou de toute autre préparation, la méthode suivante a été utilisée. Des dilutions de l'échantillon à étudier sont faites dans du lait chauffé à 90°C (par exemple 1/3, 1/9, 1/27, etc.) et réparties à raison de 5 ml dans des tubes de 18 × 180 mm qui sont ensuite ensemencés à 0,001 p. 100 avec

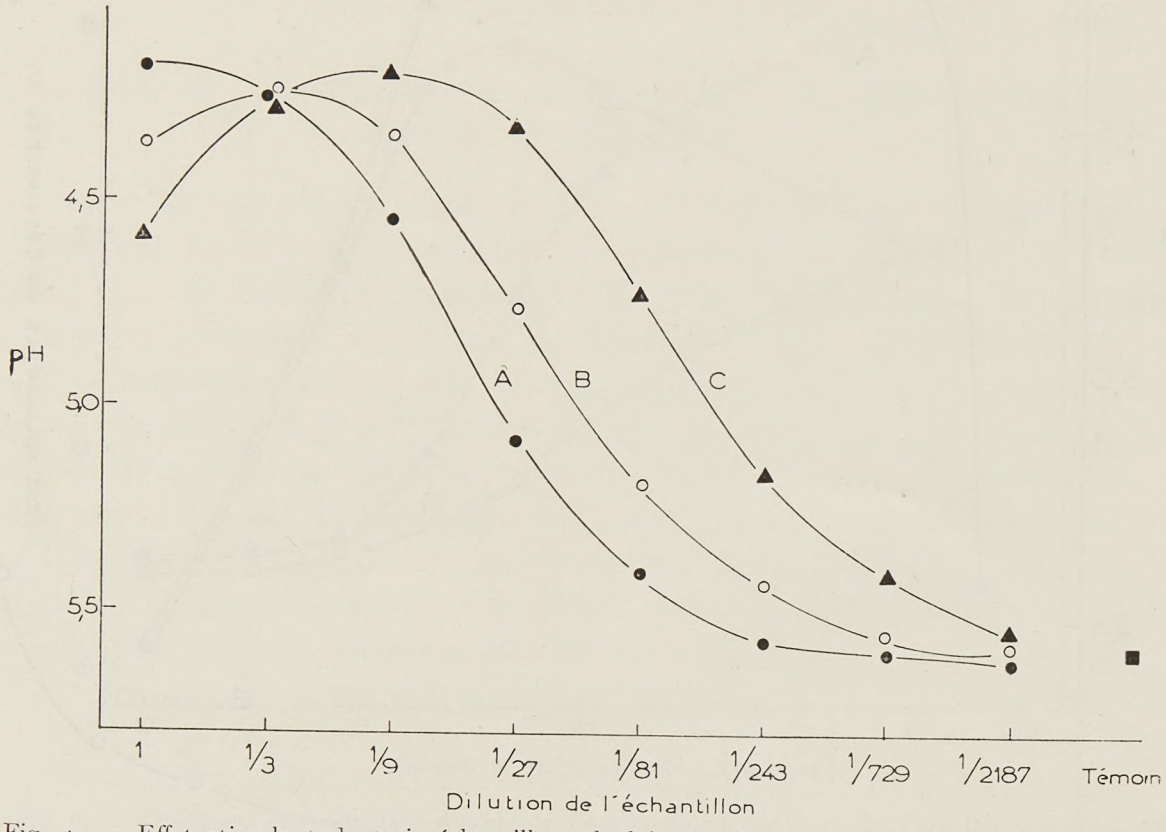


Fig. 4. — Effet stimulant de trois échantillons de lait chauffés à l'autoclave sur la production d'acide de *Lactobacillus lactis O* 37.
A : Lait chauffé 20 minutes à 120° ; B : Lait chauffé 40 minutes à 120° ; C : Lait chauffé 20 minutes à 135°. Incubation : 18 heures à 42°.

une culture sur lait, fraîche et non coagulée, de *L. lactis* O 37. Après 18 heures d'incubation à 42°C, l'acidité est mesurée comme précédemment dans chacun des tubes de culture à l'aide d'un pH-mètre à électrode de verre. On obtient ainsi une réponse graduée (pH en fonction de la dilution).

La figure 4 montre, à titre d'exemple, les courbes obtenues avec trois échantillons de lait ayant subi les traitements suivants : A : 120°, 20 minutes ; B : 120°, 40 minutes ; C : 135°, 20 minutes. On voit que ces courbes présentent des portions linéaires et parallèles. Ce fait laisse à penser que les trois échantillons contiennent, en proportions variables, la même et unique substance stimulante.

Il est alors possible, en choisissant une préparation étalon, de mesurer la quantité de substance stimulante contenue dans les différents échantillons de lait ou dans n'importe quelle préparation donnant une courbe parallèle à celle de la préparation étalon.

Si l'on prend comme étalon l'échantillon de lait chauffé à 120°C pendant 20 minutes, cet échantillon contenant par définition 100 unités de substance par ml, il est facile de calculer graphiquement à partir des courbes obtenues, les concentrations de substance active présentes dans les autres préparations. D'après la figure 4 l'échantillon B contiendra 175 unités et l'échantillon C 600 unités.

Si la quantité de substance stimulante formée au cours du chauffage du lait augmente quand on accroît la température ou le temps de chauffage, il faut remarquer que la croissance du lactobacille n'est cependant pas meilleure dans les échantillons de lait chauffés le plus fortement. On voit au contraire sur la figure 4 que l'acidité produite dans les échantillons de lait non dilués (dilution 1) est d'autant plus faible que le chauffage a été plus sévère.

III. — Expériences de dialyse.

Du lait autoclavé (120°, 20 minutes) est dialysé contre de l'eau distillée au moyen d'un tube de cellulose « Visking » de 17 mm de diamètre. L'opération est faite en chambre froide à 3°C, pendant 3 jours, l'eau distillée étant renouvelée deux fois par jour. On constate que le lait autoclavé perd ainsi toute activité stimulante (tableau I).

Tableau I

Quantité de substance stimulant la croissance de Lactobacillus lactis O 37 contenue dans différentes préparations. (Un échantillon de lait chauffé à 120° pendant 20 minutes contient par définition 100 unités de substance stimulante par millilitre.)

Lait autoclavé (120°, 20 minutes)	100 unités
Lait autoclavé dialysé	0
Dialysat du lait autoclavé	80 à 100 unités
Dialysat du lait cru, chauffé à l'autoclave (120°, 20 minutes)	80 à 140 unités
Lait dialysé, puis autoclavé	0

Si l'on reprend l'eau qui a servi à la dialyse et qu'on la concentre sous vide à 40°C jusqu'au volume initial du lait autoclavé, on retrouve la totalité de l'activité dans le « dialysat » ainsi obtenu (tableau I). La substance stimulant l'activité du lactobacille est donc dialysable.

Si, au lieu de lait autoclavé, on dialyse contre de l'eau distillée du lait cru ou chauffé à 90°C et que l'on concentre sous vide le « dialysat » ce dernier ne présente aucune activité. Mais si l'on chauffe ce dialysat à l'autoclave (120°, 20 minutes) il acquiert une activité comparable à celle du lait normal autoclavé (tableau I). Quant au lait dialysé (celui qui reste

à l'intérieur du dialyseur), il ne possède aucune activité stimulante, ni avant, ni après chauffage à l'autoclave.

Ces expériences montrent que la substance stimulante du lait autoclavé est dialysable et provient vraisemblablement de l'action du chauffage sur la fraction dialysable du lait.

IV. — Action de diverses substances sur l'activité de L. lactis 0 37.

Les principaux constituants dialysables du lait sont les sels minéraux, le lactose, et divers composés azotés de faible poids moléculaire (urée, acide urique, acides aminés, etc.) (7). Nous avons donc recherché si certains de ces corps seraient susceptibles, après chauffage, seuls ou en association, d'activer la croissance du lactobacille en les ajoutant au milieu de culture constitué par du lait chauffé à 90°C.

a) Acides aminés.

Bien que le lait contienne peu d'acides aminés à l'état libre (7), certains pourraient se former par dégradation par la chaleur de substances azotées plus complexes (protéose-peptones).

Des solutions M/100 des acides aminés suivants ont été préparées : L. alanine, acide L. aspartique, acide L. glutamique, L. arginine, L. asparagine, L. cystéine, L. glutamine, L. histidine, L. isoleucine, L. lysine (dichlorhydrate), D. L. méthionine, L. phénylalanine, D. L. proline, D. L. sérine, D. L. thréonine, L. tryptophane, L. valine. La L. cystine et la L. tyrosine peu solubles ont été utilisées aux concentrations respectives de 0,01 p. 100 et de 0,05 p. 100. Après ajustement à pH neutre ces solutions étaient stérilisées à l'autoclave (120°C, 20 minutes). Des dilutions de ces solutions étaient ajoutées à du lait chauffé à 90°C pour la détermination de leur activité éventuelle sur *L. lactis* O 37 ainsi qu'il a été décrit précédemment.

Nous avons ainsi constaté que certains acides aminés favorisent légèrement la croissance du lactobacille dans le lait chauffé à 90°C (proline, tyrosine, leucine, tryptophane) ; aucun cependant ne montre une activité stimulante comparable à celle du lait autoclavé.Certains acides aminés (sérine, alanine) présentent par contre un effet inhibiteur très net pour les concentrations les plus élevées utilisées.

Différentes combinaisons de ces acides aminés se révélèrent également sans activité.

b) Urée. Acide urique.

Ces composés constituent la plus grande partie de la fraction azotée non protéique du lait (7). Nous avons constaté qu'aucun de ces composés chauffés à l'autoclave ne présente d'activité.

c) **Lactose.**

Une solution de lactose à 5 p. 100 dans de l'eau distillée, chauffée à l'autoclave ou stérilisée par filtration, ne montre aucune activité sur la croissance de *L. lactis* O 37. Au contraire une solution de lactose à 5 p. 100 en tampon phosphate de Sörensen à pH 6,6 présente, après chauffage, une activité stimulante comparable à celle du lait autoclavé (fig. 5). Un effet

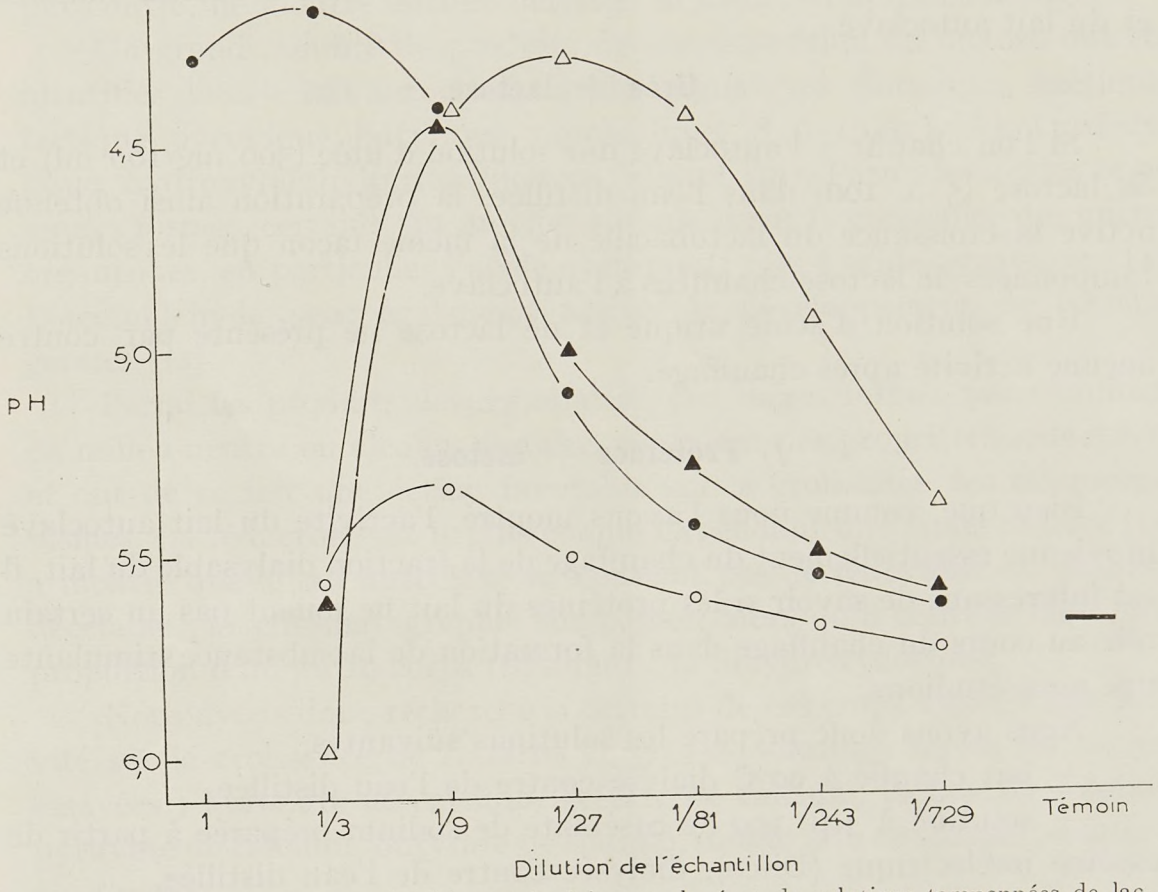


Fig. 5. — Effets stimulants et inhibiteurs du lait autoclavé et de solutions tamponnées de lactose chauffées à l'autoclave (30 min. à 120°) sur la production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37.

●—● Lait autoclavé.
○—○ Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 5,3.
△—△ Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 7,5.
▲—▲ Solution de lactose (5 p. 100) tamponnée à pH 6,6.

inhibiteur est toutefois observé dans la première dilution de la solution de lactose (1/3 de solution de lactose pour 2/3 de lait chauffé à 90°). Le pH de la solution tamponnée de lactose au moment du chauffage à l'autoclave a un rôle déterminant : tandis que la solution de lactose chauffée à pH 5,3 ne présente qu'une très faible activité, la solution chauffée à pH 7,5 est environ 10 fois plus active que la solution chauffée à pH 6,6 (fig. 5). Une augmentation de pH favorise donc la formation de la substance stimulante mais elle augmente aussi l'effet inhibiteur qui est alors visible jusqu'à la dilution 1/9.

d) Acides aminés + lactose.

Des solutions aqueuses d'acides aminés (les mêmes que précédemment) et de lactose (5 p. 100) sont chauffées à l'autoclave (120°C, 20 minutes) et ajustées à pH 6,6 avec de la soude. Aucune de ces préparations ne montre d'activité stimulante importante.

Par contre les mêmes solutions d'acides aminés et de lactose préparées en tampon phosphate (pH 6,6) et chauffées à l'autoclave présentent une activité semblable à celle de la solution tamponnée de lactose chauffée et du lait autoclavé.

e) Urée + lactose.

Si l'on chauffe à l'autoclave une solution d'urée (300 mg/100 ml) et de lactose (5 p. 100) dans l'eau distillée, la préparation ainsi obtenue active la croissance du lactobacille de la même façon que les solutions tamponnées de lactose chauffées à l'autoclave.

Une solution d'acide urique et de lactose ne présente par contre aucune activité après chauffage.

f) Protéines + lactose.

Bien que, comme nous l'avons montré, l'activité du lait autoclavé provienne essentiellement du chauffage de la fraction dialysable du lait, il est intéressant de savoir si les protéines du lait ne jouent pas un certain rôle au cours du chauffage dans la formation de la substance stimulante que nous étudions.

Nous avons donc préparé les solutions suivantes :

— lait chauffé à 90°C dialysé contre de l'eau distillée,

— solution à 3 p. 100 de caséinate de sodium préparée à partir de caséine isoélectrique (Difco), dialysée contre de l'eau distillée,

— solution de phosphocaséinate de calcium obtenu par ultra-centrifugation de lait à 30 000 t/min. dans une centrifugeuse « Sharples », dialysée contre de l'eau distillée.

Ces différentes solutions, chauffées à l'autoclave ne montrèrent qu'une activité faible ou nulle sur la croissance du lactobacille.

Les mêmes solutions, additionnées de 5 p. 100 de lactose et autoclavées montrèrent par contre une activité tout à fait comparable à celle d'une solution tamponnée de lactose chauffée à pH 6,6. Il en était de même des solutions effectuées en tampon phosphate à pH 6,6 et chauffées à l'autoclave.

g) Produits de dégradation du lactose.

Les résultats précédents montrent que la substance stimulante qui se forme au cours du chauffage du lait à l'autoclave est vraisemblable-

ment un produit de dégradation du lactose, puisque du lactose chauffé en milieu neutre ou alcalin, en présence de phosphates, de caséine ou d'urée, est capable d'activer la croissance de *L. lactis* O 37 de la même façon que le lait autoclavé.

Nous avons pu constater que le glucose et le galactose, qui n'ont par eux-mêmes aucun effet stimulant sur le lactobacille, acquièrent après chauffage en tampon phosphate à pH 6,6 une activité semblable à celle que donne le lactose chauffé dans les mêmes conditions. Le saccharose, par contre, ne montre aucune activité, ni avant ni après chauffage.

Un grand nombre de produits de décomposition du lactose ont été identifiés dans le lait autoclavé : acides organiques (formique, acétique, lactique, pyruvique, butyrique, propionique) (8, 9, 10, 11), alcool furfurylique, hydroxyméthylfurfuraldéhyde, maltol (12). Parmi les acides organiques formés, certains ont un effet stimulant sur la croissance des microorganismes, en particulier l'acide acétique (13) et l'acide pyruvique (14). L'acétaldéhyde peut également activer le développement de certains germes (14).

Parmi les produits de dégradation des sucres formés par chauffage en milieu neutre ou alcalin, certains possèdent des propriétés réductrices et ont de ce fait une action favorable sur la croissance des microorganismes. La réductone est le plus connu. Cependant une étude récente (15) a montré que le lait autoclavé ne contient pas de réductone en quantité décelable par chromatographie sur papier, alors qu'il contient une forte proportion d'un autre corps réducteur : la dihydroxyacétone.

Nous avons donc recherché si certains de ces corps avaient une activité sur la croissance de *L. lactis* O 37. Les solutions suivantes ont été essayées : Formiate de calcium, acétate de calcium, lactate de calcium, pyruvate de calcium, butyrate de sodium, propionate de sodium : solutions à 0,1 p. 100.

Acides caproïque, caprylique, valérianique : solutions à 0,1 p. 100, neutralisées par la soude.

Furfurol, alcool furfurylique, acétaldéhyde, dihydroxyacétone : solutions à 0,1 p. 100.

Des dilutions de ces solutions étaient préparées dans du lait chauffé à 90°C et ensemencées avec *L. lactis* O37 (inoculum 0,001 p. 100) et le pH des cultures mesuré après incubation de 16 heures à 42°C.

Parmi tous ces corps seul le formiate se montra doué de propriétés stimulantes pour *L. lactis* O 37. La solution de formiate de calcium à 0,1 p. 100 est environ 6 fois plus active que le lait autoclavé.

h) **Facteurs de croissance et substances diverses.**

Le lait contient dans sa fraction dialysable un grand nombre de facteurs de croissance. On peut se demander si le chauffage du lait à l'auto-

clave n'augmente pas la concentration de certains d'entre eux. On sait par exemple que le chauffage à l'autoclave du lait de truie libère la vitamine B_{12} qui existe dans ce lait liée à une protéine, sous une forme non assimilable pour les micro-organismes (16).

Les facteurs de croissance suivants ont donc été essayés aux concentrations indiquées :

Pantothénate de calcium, biotine, amide de l'acide nicotinique, riboflavine, acide paraminobenzoïque, pyridoxine, thiamine, acide folique, vitamine B_{12} : solutions à 1 mg p. 100 ml.

Mesoinositol, choline : solutions à 2,5 mg p. 100 ml.

Glutamine, adénine, guanine, xanthine, uracile, thymine : solutions à 100 mg p. 100 ml.

Plusieurs substances réductrices : cystéine et glutathion à 1 p. 100, acide ascorbique à 2,5 p. 100 ainsi qu'une solution de peptone « Evans » à 1 p. 100 ont également été essayées.

Parmi les facteurs de croissance employés, seuls les composés puriques se sont montrés actifs. Une solution d'adénine à 10 mg p. 100 ml présentait en effet une activité comparable à celle du lait autoclavé. L'acide ascorbique par ailleurs était actif à haute concentration, la solution contenant 2,5 g p. 100 ml étant environ 2 fois plus active que le lait autoclavé.

La solution de peptone montrait également une forte activité stimulante. A la concentration de 1 p. 100 la peptone est deux fois plus active que le lait chauffé pendant 20 minutes à 120°C.

V. — Identification de la substance stimulante du lait autoclavé.

L'ensemble des résultats précédents montre que la substance du lait autoclavé qui active la croissance de *L. lactis* O 37 est vraisemblablement un produit de dégradation du lactose. Nous avons vu d'autre part que, parmi les corps provenant de la dégradation du lactose dont la présence a été décelée dans le lait autoclavé, seul le formiate s'est montré actif.

D'après Gould, l'acide formique, qui représente 80 p. 100 des acides volatils formés au cours du chauffage à l'autoclave, se trouverait dans le lait autoclavé (116°C, 1 heure) à la dose d'environ 10 mg p. 100 ml (9, 10). Or les essais que nous avons décrits ont démontré que le lait autoclavé (120°C, 20 minutes) avait sensiblement la même activité que le lait chauffé à 90°C additionné de 15 mg de formiate de calcium. On a donc tout lieu de penser que la substance stimulante que nous cherchons à identifier est précisément l'acide formique. Les essais suivants ont pour but de confirmer cette identité.

Dans ces essais, nous avons utilisé, pour mesurer l'activité de nos préparations, la méthode de dosage décrite précédemment, en employant comme solution étalon non plus du lait autoclavé, mais une solution de

formiate de calcium à 14,1 mg p. 100 ml (cette solution contient 10 mg d'acide formique p. 100 ml). Son activité fixée arbitrairement à 100 unités par ml (1 000 unités = 1 mg d'acide formique), correspond sensiblement à celle du lait autoclavé à 125°C pendant 30 minutes.

a) **Séparation par échange d'ions.**

Un « dialysat » de lait autoclavé, est préparé en plongeant un tube de cellulose « Visking » rempli d'eau distillée (100 ml) dans une éprouvette contenant 2 litres de lait autoclavé (125°C, 30 min.). Après 24 heures de dialyse à 3°C le liquide restant à l'intérieur du tube de cellulose est retiré. Il possède une activité stimulante sensiblement égale à celle du lait autoclavé. En répétant cette opération plusieurs fois, on obtient ainsi facilement une quantité importante de « dialysat » actif.

Le liquide ainsi obtenu est passé successivement sur une colonne de résine échangeuse de cations : « Permutite 50 », préparée par la méthode de Moore et Stein (17), puis sur une colonne de résine échangeuse d'anions : « Amberlite IRA 410 », préparée par la méthode de Bryant et Overell (18).

Après passage du dialysat et lavage des colonnes à l'eau, la permutite est éluée par une solution normale d'ammoniaque tandis que l'amberlite est éluée par une solution normale de carbonate d'ammonium.

Par cette technique de séparation les corps neutres et en particulier le lactose du dialysat passent dans l'effluent, les cations et les acides aminés se retrouvent dans l'éluat de la permutite, les anions et les acides organiques dans l'éluat de l'amberlite.

Les trois solutions obtenues sont ensuite concentrées sous vide à 45°C, ce qui permet d'éliminer en même temps l'ammoniaque des éluats. Ces préparations concentrées sont stérilisées par filtration sur filtre Seitz et leur activité stimulante est déterminée.

On constate alors que seul l'éluat de l'amberlite présente une activité. On retrouve en effet dans cette fraction 50 p. 100 de la substance stimulante du dialysat, les deux autres fractions étant complètement inactives. La substance stimulante que nous recherchons se comporte donc bien comme un acide organique.

b) **Distillation.**

La solution active obtenue ainsi qu'il vient d'être décrit par élution de l'amberlite au moyen du carbonate d'ammonium est distillée suivant une méthode semblable à celle décrite par Gould (9) : 250 ml de solution sont acidifiés par SO_4H_2-N jusqu'à pH 2. On entraîne par la vapeur en maintenant la solution dans un bain d'eau salée à 103-104° afin de conserver un volume constant. Quelques gouttes d'un antimousse aux silicones

(Rhodorsil) [1] permettent d'éviter le moussage. La distillation est conduite de façon à recueillir 900 ml de distillat, par portions de 100 ml, en 1 h. 30.

De la même façon on a procédé à la distillation directe de lait autoclavé (125°C, 30 minutes), de lait chauffé à 90°C, de lait chauffé à 90°C additionné de 15 mg de formiate p. 100 ml ; et enfin d'une solution tamponnée de lactose (pH 6,6) chauffée à l'autoclave (125°C, 30 min.).

Le tableau II donne les résultats ainsi obtenus. On voit tout d'abord que le lait chauffé à 90°C contient des acides volatils sans activité. D'autre part on retrouve pour les différentes préparations actives soumises à la distillation 60 à 68 p. 100 de l'activité présente initialement dans ces préparations. C'est en particulier le cas du lait chauffé à 90°C additionné de formiate et pour lequel on retrouve dans le distillat 60 p. 100 de l'activité initiale.

TABLEAU II

Préparations soumises à la distillation (250 ml)	Activité des préparations avant distillation (nombre d'unités)*	Quantité de soude N/20 nécessaire pour neutraliser les distillats (ml)	Activité des distillats (nombre d'unités)*	Pourcentage d'activité retrouvée après distillation	Activité par ml de soude N/20 ajoutée au distillat (nombre d'unités)*
Lait chauffé à 90°C :					
(*a*	0	3,90	0		
(*b*	0	4,80	0		
(*c*	0	5,35	0		
Lait chauffé à 90°C (*b*) + 15 mg formiate pour 100 ml	26 500	12,05	15 900	60	1 320
Lait autoclavé (125°C, 30 min.)					
(*a*	25 000	11,40	16 100	64	1 400
(*b*	26 900	14,10	17 500	65,5	1 240
Solution tamponnée de lactose chauffée	556 000	187,00	342 000	61,5	1 830
Éluat de l'amberlite (20 ml dilués dans 250 ml)	44 500	18,60	30 500	68	1 640

a : lait d'une seule vache : « Vinette », *b* : lait d'une seule vache : « Unité 12 », *c* : lait de mélange de plusieurs vaches.

*1 unité = quantité de substance possédant la même activité stimulante sur *L. lactis* O 37 que 1γ d'acide formique.

La dernière colonne du tableau II donne le rapport entre l'activité des distillats et les quantités de soude nécessaires pour neutraliser ces distillats. Si toute l'acidité des distillats était due à l'acide formique, on trouverait dans ces distillats une activité de 2 300 unités par ml de soude ajoutée (1 ml de soude N/20 correspond à 2,3 mg d'acide formique soit à 2 300 unités de substance stimulante). Le fait que, pour les différentes préparations étudiées, on trouve des activités variant de 1 240 à 1 830 unités par ml de soude ajoutée indique que ces préparations contiennent, en plus de l'acide formique, d'autres acides volatils sans activité : ce sont les acides

[1] Anti-mousse 426 fabriqué par Rhône-Poulenc.

que l'on trouve dans le lait chauffé à 90°C et qui sont responsables de l'acidité du distillat correspondant.

c) Chromatographie.

Les distillats obtenus, ainsi qu'il vient d'être décrit, à partir de lait chauffé à 90°C, de lait autoclavé (125°C, 30 minutes) et d'une solution tamponnée de lactose chauffée à l'autoclave ont été étudiés par chromatographie sur papier suivant la méthode de GUILLAUME et OSTEUX (19) qui permet de séparer les acides gras à faible poids moléculaire.

Méthode.

Pour le lait chauffé à 90°C et le lait autoclavé, la distillation est conduite en quatre opérations, de façon à obtenir, à partir d'un litre de lait, 3 600 ml de distillat. Ce distillat est neutralisé par NaOH N/20 et concentré à 1 ml par évaporation sous vide. La préparation est ensuite traitée par la « Permutite 50 » afin d'éliminer les ions Na^+, puis neutralisée par la morpholine. On obtient ainsi 13 ml de préparation qui est soumise à l'analyse chromatographique. Des spots de 0,02 ml sont déposés sur le papier (Whatman 3). Chaque spot correspond environ à 1,5 ml de lait.

La solution tamponnée de lactose (lactose : 5 p. 100, pH 6,6, chauffée à 125°C pendant 30 min.) est distillée en deux opérations permettant d'obtenir à partir de 500 ml de solution 1 800 ml de distillat. Comme précédemment, ce distillat est neutralisé par NaOH, concentré sous vide, traité par la permutite et neutralisé par la morpholine. Les spots de 0,02 ml de cette préparation correspondent à 0,07 ml de la solution initiale.

Une solution témoin constituée par un mélange des acides formique, acétique, propionique, butyrique (1 g p. 100 ml) et caproïque (0,4 g p. 100 ml) est analysée simultanément. Les spots de 0,01 ml de cette solution déposés sur le papier correspondent à 100 γ de chacun des acides formique, acétique, propionique et butyrique et à 40 γ d'acide caproïque.

Le solvant utilisé est le suivant (proportions en volumes) :

Butanol	30
Cyclohexane	30
Propylène glycol	10
Ammoniaque	0,7
Morpholine	0,07
Eau	3,5

Après une chromatographie descendante de 24 heures, les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation d'un indicateur à base d'ortho-crésol-sulfone-phtaléine et de véronal sodique, suivant une technique décrite par GUILLAUME et al. (20).

Résultats.

La figure 6 montre le chromatogramme obtenu.

Dans le distillat de lait chauffé à 90 °C (échantillon n° 4) on n'observe aucune trace d'acide. Cette méthode de chromatographie ne permet donc pas de déceler les petites quantités d'acide trouvées dans le distillat.

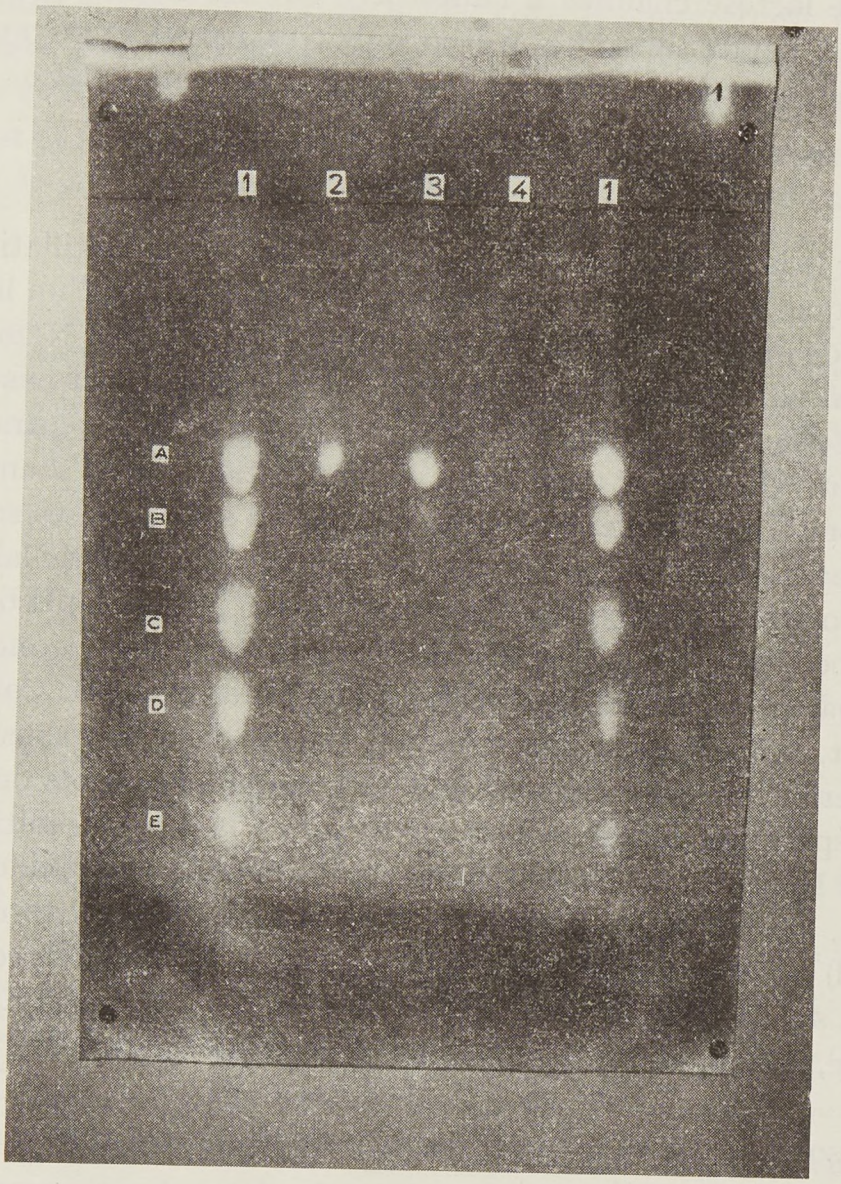


Fig. 6. — Chromatogramme obtenu par la méthode de Guillaume et Osteux. Échantillon 1 : Mélange des acides formique, acétique, propionique, butyrique et caproïque. — Échantillon 2 : Distillat d'une solution tamponnée (pH 6,6) de lactose (5 p. 100) chauffée à l'autoclave. — Échantillon 3 : Distillat de lait autoclavé. — Échantillon 4 : Distillat de lait chauffé à 90°. — A : acide formique, B : acide acétique, C : acide propionique, D : acide butyrique, E : acide caproïque.

Le distillat de lait autoclavé (échantillon n° 3)donne une tache très nette d'acide formique. Cette tache présente sensiblement la même surface que la tache correspondant à 100 γ d'acide formique du mélange témoin. Cela correspond à une concentration de 6,6 mg d'acide formique

pour 100 ml de lait. Si l'on tient compte d'une perte d'environ 40 p. 100 d'acide formique au cours de la distillation, on peut évaluer la quantité d'acide formique contenu dans le lait autoclavé à environ 11 mg p. 100 ml. On peut d'autre part observer pour l'échantillon de lait autoclavé (n° 3) une tache nette d'acide acétique. Cet acide acétique s'est formé en même temps que l'acide formique au cours du traitement du lait à l'autoclave, puisque l'échantillon de lait chauffé à 90°C ne montre aucune trace d'acide.

La solution tamponnée de lactose donne également une tache très marquée d'acide formique. Les autres acides présents dans le distillat ne sont pas décelables sur le chromatogramme.

VI. — Action de l'acide formique et de l'adénine sur la croissance des lactobacilles dans le lait.

Nous avons vu dans les essais précédents que l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *L. lactis* O 37 était dû à la présence dans ce lait d'acide formique, formé au cours du chauffage. Un effet stimulant semblable est obtenu par addition de formiate de calcium à du lait chauffé à 90°C ainsi que par addition d'adénine à ce même lait. Dans les expériences qui suivent nous avons comparé d'une part les courbes de croissance obtenues avec *L. lactis* O 37 dans du lait chauffé à 90°C seul ou additionné de formiate ou d'adénine, d'autre part l'effet de ces mêmes substances sur le développement de différentes souches de lactobacilles appartenant aux espèces *L. lactis* et *L. bulgaricus*.

a) Croissance de *L. lactis O* 37 dans le lait additionné de formiate ou d'adénine.

Du lait prélevé et écrémé stérilement est réparti en tubes à raison de 4 ml de lait par tube et chauffé à 90°C pendant 20 minutes. Ces tubes sont additionnés soit de 0,5 ml d'une solution de formiate de calcium à 140 mg p. 100 ml, soit de 0,5 ml de solution d'adénine à 40 mg p. 100 ml, soit de 0,5 ml d'eau. Des tubes de lait autoclavé (120°, 25 min.) sont préparés de la même façon en ajoutant 0,5 ml d'eau à 4 ml de lait autoclavé.

Ces tubes sont ensemencés avec 0,5 ml d'une dilution au 1/10 000 d'une culture fraîche et non coagulée de *L. lactis* O 37, puis ils sont placés dans un bain-marie réglé à 42°C ± 0°2. Après 0 h, 2 h 30, 5 h, 7 h 30, 10 h, 12 h 30, 24 h, deux tubes de chaque catégorie de ces laits sont retirés du bain-marie et l'on effectue sur chacun de ces tubes une numération sur gélose de Briggs et une mesure du pH.

La figure 7 montre les résultats ainsi obtenus. On constate que la croissance du lactobacille est sensiblement la même dans le lait chauffé à 90°C additionné de formiate, dans le lait additionné d'adénine et dans le

lait autoclavé. Les courbes d'acidification correspondantes sont semblables. La croissance de *L. lactis* O 37 de même que sa production d'acide est en tout cas beaucoup plus élevée dans ces trois préparations que dans le lait simplement chauffé à 90°C.

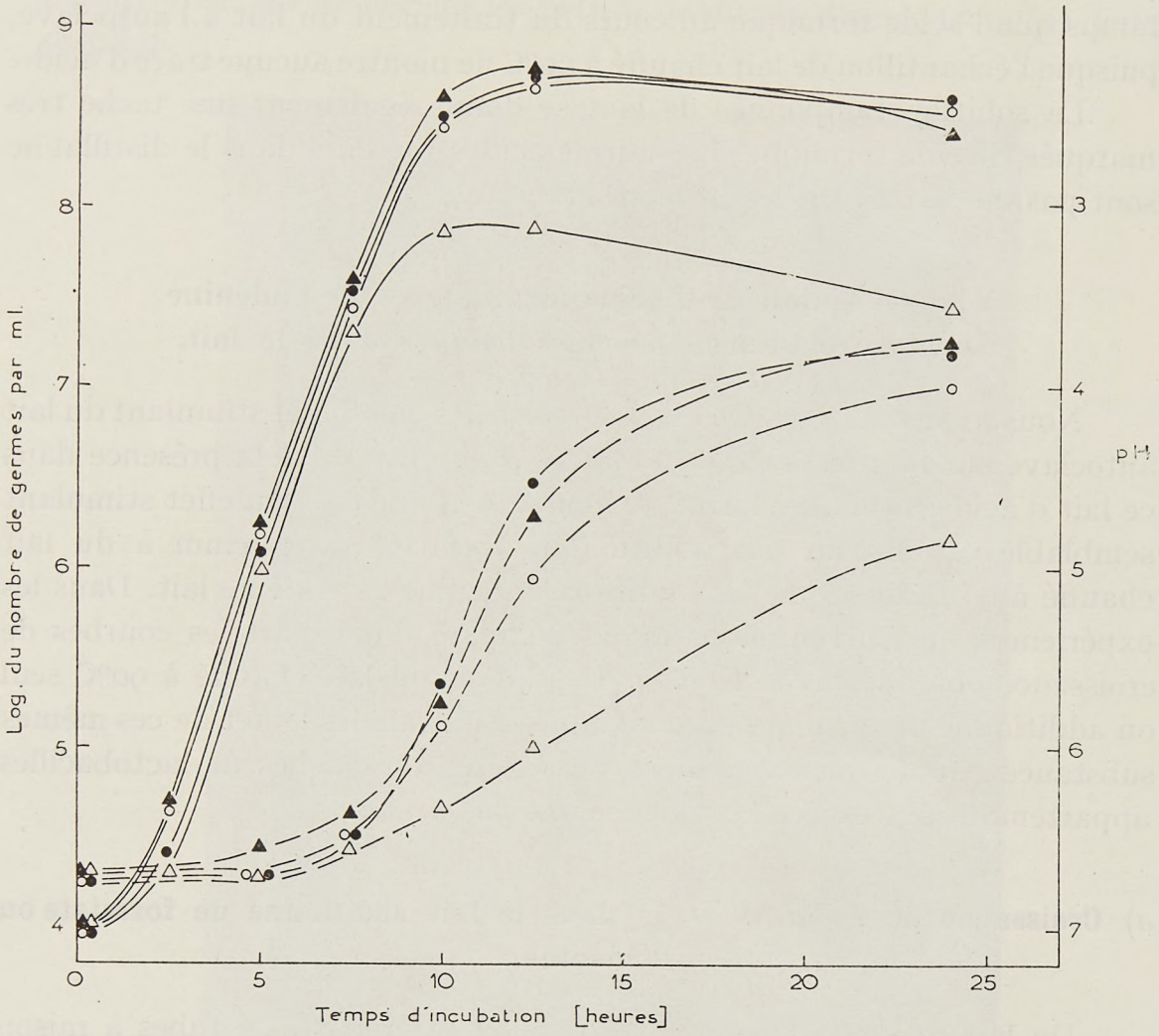


Fig. 7. — Croissance et production d'acide de *Lactobacillus lactis* O 37 : △ : dans du lait chauffé à 90°. — ○ : dans du lait chauffé à 90° additionné de formiate de calcium (14 mg p. 100 ml de lait). — ● : dans du lait chauffé à 90° additionné d'adénine (4 mg p. 100 ml de lait). — ▲ : dans du lait autoclavé.

b) **Action de l'acide formique et de l'adénine sur la croissance de plusieurs souches de *L. lactis* et *L. bulgaricus*.**

Sept souches de lactobacilles identifiées d'après la méthode de classification de BRIGGS (21) et WHEATER (22) ont été utilisées pour ces essais. Ce sont :

L. lactis : O 37 - L_3 - L_4,

L. bulgaricus : LB - LY_1 - LY_2 - LJ_3.

Des tubes, préparés comme il vient d'être décrit dans le paragraphe précédent (lait chauffé à 90°C seul et additionné de formiate, d'adénine ou de lait autoclavé), sont ensemencés à l'aide de cultures fraîches des lacto-

bacilles (inoculum 0,001 p. 100) et incubés à 42°C pendant 18 heures. Le pH des cultures est alors déterminé au pH-mètre à électrode de verre.

Nous avons pu ainsi constater que, pour tous les organismes essayés, la production d'acide dans le lait chauffé à 90°C est nettement améliorée par l'addition à ce lait d'adénine et surtout de formiate. Ce dernier permet d'obtenir en général une acidification tout à fait comparable à celle que l'on observe dans le lait chauffé à 90°C additionné de lait autoclavé (1/5) dans lequel la croissance des lactobacilles est la meilleure.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats précédents montre que l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance des lactobacilles est dû principalement à la présence dans ce lait d'acide formique formé à partir du lactose au cours du chauffage à l'autoclave.

Les produits de dégradation des protéines formés au cours du chauffage, qui sont par ailleurs très actifs sur certaines espèces de streptocoques lactiques, particulièrement *Str. thermophilus* (4, 5, 23), ne semblent pas avoir de rôle important dans l'activation des lactobacilles.

Le phénomène de stimulation des bactéries lactiques par des substances provenant de la décomposition des sucres par chauffage a déjà été observé par de nombreux auteurs lors de la culture de différentes espèces bactériennes dans des milieux, contenant des sucres réducteurs, stérilisés à l'autoclave (14, 24, 25, 26, 27, 28, 29). L'effet stimulant ainsi observé a été attribué soit à des substances réductrices formées au cours du chauffage du milieu de culture (25), soit à des substances jouant le rôle d'accepteurs d'hydrogène dans le métabolisme initial des hydrates de carbone, tels que l'acide pyruvique ou l'acétaldéhyde (14), soit encore à des produits d'interaction du glucose et des composés azotés tels que la N-glucosyl-glycine (28). Il faut remarquer cependant que le phénomène de stimulation observé par les différents auteurs cités porte sur l'« initiation » de la croissance des microorganismes, c'est-à-dire leur développement rapide à partir d'un faible inoculum, tandis que, nous l'avons montré, l'acide formique favorise avant tout la croissance totale des lactobacilles.

Parmi les différents facteurs de croissance stimulant le développement de *L. lactis* O 37 dans le lait chauffé à 90°C, seuls les composés puriques et l'acide ascorbique se sont montrés actifs. Mais tandis que l'acide ascorbique n'agissait qu'à très forte concentration, l'adénine avait une action à faible dose comparable à celle de l'acide formique. Il est difficile de dire si les phénomènes de stimulation par l'adénine et par l'acide formique sont liés ; cependant, étant donné le rôle fondamental de l'acide formique dans la synthèse biologique des purines chez l'animal (30, 31, 32), chez la le-

vure (33) et chez *Escherichia coli* (34), on peut supposer que l'acide formique intervient également comme métabolite intermédiaire dans la synthèse de l'adénine par *L. lactis*, et que, dans un milieu déficient en adénine tel que le lait autoclavé, l'acide formique se comporte comme un facteur de croissance pour cet organisme.

Nous avons enfin montré que, malgré l'influence stimulante considérable du lait autoclavé sur le développement de *L. lactis* O 37, la croissance maxima de cet organisme n'est atteinte cependant que dans les mélanges de lait autoclavé et de lait chauffé à 90°C (fig. 3 et 4). Nous avons attribué cet effet inhibiteur du lait autoclavé à une déficience de ce lait en une ou plusieurs substances de croissance, présentes en plus grande quantité dans le lait chauffé à 90°C.

Ce phénomène d'inhibition, particulièrement marqué dans le lait ayant subi un chauffage prolongé à l'autoclave, a déjà été observé, nous l'avons dit, par plusieurs auteurs (2, 4, 5). Il était attribué par certains à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose.

Ces observations sont à rapprocher des résultats obtenus par de nombreux auteurs sur l'influence défavorable de la stérilisation à l'autoclave des milieux de culture contenant des sucres réducteurs : un tel chauffage provoque en effet la disparition de substances de croissance variées et particulièrement des acides aminés soufrés (35, 36, 37, 38) et aussi la formation de substances inhibant le développement des bactéries (23, 39).

Reçu pour publication le 29 *mars* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Auclair (J. E.) et Portmann (A.). — Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. I. Croissance des bactéries lactiques dans des laits chauffés à des températures variables. *Ann. I. N. R. A., Série E, Techn.*, **4,** 121-131, 1955.

(2) Orla-Jensen (S.) et Jacobsen (J.). — Neue Untersuchungen über die bakteriziden Eigenschaften der Milch. *Zlb. Bakt. Parasitenk*, II Abt., **80,** 321-341, 1930.

(3) Tyler (M. E.) et Weiser (H. H.). — Factors affecting Swiss cheese starter activity. Effect of heat treatment and source of milk. *J. Dairy Sci.*, **25,** 939-948, 1942.

(4) Foster (E. M.). — The effect of heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **35,** 988-997, 1952.

(5) Parker (R. B.) et Elliker (P. R.). — Effect of heat treatment of milk on subsequent activity of starter culture. *Proc. W. Div. Amer. Sci. Ass.*, 361-365, 1954.

(6) Briggs (M.). — An improved medium for lactobacilli. *J. Dairy Res.*, **20,** 36-40, 1953.

(7) Shahani (K. M.) et Sommer (H. H.). — The protein and non-protein nitrogen fractions in milk. II. Their content in fresh raw milk. *J. Dairy Sci.*, **34,** 1010-1013, 1951.

(8) Gould (I. A.). — The formation of volatile acids in milk by high-temperature heat treatment. *J. Dairy Sci.*, **28,** 379-386, 1945.
(9) Gould (I. A.) et Frantz (R. S.). — Formic acid content of milk heated to high temperatures as determined by the distillation procedure. *J. Dairy Sci.*, **29,** 27-31, 1946.
(10) Kern (J.), Weiser (H. H.), Harper (W. J.) et Gould (I. A.). — Observations on organic acids formed during the heat sterilization of milk. *J. Dairy Sci.*, **37,** 904, 1954.
(11) Morr (C. V.), Harper (W. J.) et Gould (I. A.). — Some organic acids in raw and heated skimmilk. *J. Dairy Sci.*, **40,** 964-972, 1957.
(12) Patton (S.). — Lactose degradation in heated milk. *J. Dairy Sci.*. **33,** 410, 1950.
(13) Snell (E. E.). — The nutrition of the lactic acid bacteria. *Bact. revs.*, **16**, 235-241, 1952.
(14) Smiley (K. L.), Niven (C. F.), Sherman (J. R.) et (J. M.). — The nutrition of *Str. salivarius*. *J. Bact.*, **45,** 445-454, 1943.
(15) Krauss (B.). — Zur Kenntnis der Veränderungen des Milchzuckers beim Erhitzen von neutralen, wässerigen Lösungen und Milch. *Kieler Milchw. Forschungsberichte,* **7,** 289-322, 1955.
(16) Gregory (M. E.), Ford (J. E.) et Kon (S. K.). — A vitamin B_{12} binding factor in sow's milk. *Biochem. J.*, **51,** XXIX, 1952.
(17) Moore (S.) et Stein (W. H.). — Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **192,** 663-681, 1951.
(18) Bryant (K.) et Overell (B. T.). — Quantitative chromatographic analysis of organic acids in plant tissue extracts. *Biochem. Biophys. Acta,* **10,** 471-476, 1953.
(19) Guillaume (J.) et Osteux (R.). — Détermination des acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6 dans les liquides biologiques par chromatographie sur papier. *C. R. Acad. Sci.*, **241,** 501-502, 1955.
(20) Guillaume (J.), Beerens (H.) et Osteux (R.). — La chromatographie sur papier des acides aliphatiques volatils de C_1 à C_6. Son application à la détermination des bactéries anaérobies. *Ann. Inst. Pasteur Lille,* **8,** 13-52, 1956.
(21) Briggs (M.). — The classification of lactobacilli by means of physiological tests. *J. Gen. Microbiol.*, **9,** 234-248, 1953.
(22) Wheater (D.). — The characteristics of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Gen. Microbiol.*, **12,** 123-132, 1955.
(23) Auclair (J. E.) et Portmann (A.). — Influence du chauffage du lait aux températures de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance des bactéries lactiques. 14e *Congrès intern. Laiterie,* Rome, 1956, vol. I, partie 2, pp. 17-30.
(24) Orla-Jensen (A. D.). — Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.*, **52,** T, 374-379, 1933.
(25) Rabinowitz (J. C.) et Snell (E. E.). — The vitamin B_6 group. XI. An improved method for assay of vitamin B_6 with *Str. faecalis*. *J. Biol. Chem.*, **169,** 631-642, 1947.
(26) Snell (E. E.), Kitay (E.) et Hoff-Jorgensen (E.). — Carbohydrate utilization by a strain of *Lactobacillus bulgaricus*. *Arch. Biochem.*, **18,** 495-510, 1948.
(27) Hoffmann (C. E.), Stokstad (E. L. R.), Hutchings (B. L.), Dornbush (A. C.), Jukes (T. H.). — The microbiological assay of vitamin B_{12} with *Lactobacillus leichmanii*. *J. Biol. Chem.*, **181,** 635-644, 1949.
(28) Rogers (D.), King (T. E.) et Cheldelin (V. H.). — Growth stimulation of *Lactobacillus gayoni* by N-D-glucosylglycine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **82,** 140-144, 1953.
(29) Ramsey (H. H.) et Lankford (C. E.). — Stimulation of growth initiation by heat degradation products of glucose. *J. Bact.*, **72,** 511-518, 1956.

(30) TOTTER (J. R.), VOLKIN (E.) et CARTER (C. E.). — Incorporation of isotopic formate into the nucleotides of ribo and desoxyribonucleic acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **73,** 1521-1522, 1951.

(31) SMELLIE (R. M. S.), Mc INDOE (W. M.) et DAVIDSON (J. N.). — The incorporation of ^{15}N, ^{35}S and ^{14}C into nucleic acids and proteins of rat liver. *Biochem. Biophys. Acta*, **11,** 559-565, 1953.

(32) HAYDAR (G. A.), CHERNIGOY (F.), KHATCHADOURIAN (A.) et KERR (S. E.). — Incorporation of C^{14} labeled glycine and formate by the acid-soluble guanine and adenine nucleotides of rat liver. *J. Biol. chem.*, **221,** 707-712, 1957.

(33) KERR (S. E.) et CHERNIGOY (F.). — On the biosynthesis of ribonucleic acid purines and their interconversion in yeast. *J. Biol. Chem.*, **200,** 887-894, 1953.

(34) TOMISEK (A. J.), KELLY (H. J.) et SKIPPER (H. E.). — Chromatographic studies of purine metabolism. I. The effect of azaserine on purine biosynthesis in *E. coli* using various C^{14} labeled precursors. *Arch. Biochem. Biophys.*, **64,** 437-455, 1956.

(35) PATTON (A. R.) et HILL (E. G.). — Inactivation of nutrients by heating with glucose. *Science*, **107,** 68-69, 1948.

(36) Mc ALLISTER (R. A.). — The inactivation of certain nutrients in culture media by heating with glucose and its relation to the growth of certain lactobacilli. *J. med. lab. Tech.*, **12,** 74-79, 1954.

(37) LANKFORD (C. E.), RAVEL (J. M.) et RAMSEY (H. H.). — The effect of glucose and heat sterilization on bacterial assimilation of cystine. *Appl. Microbiol.*, **5,** 65-69, 1957.

(38) AUCLAIR (J. E.). — Studies on the antibacterial properties of cow's milk. Ph. D. Thesis, University of Reading, 1953.

(39) FINKELSTEIN (R. A.) et LANKFORD (C. E.). — A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. *Appl. Microbiol.*, **5,** 74-79, 1957.

SUR LA MICROFLORE BACTÉRIENNE DES PAINS DE LEVURE PRESSÉE DE BOULANGERIE

PAR

Mme J. POISSON

Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales, Paris

---

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Étude quantitative et qualitative des bactéries présentes dans les pains de levures.

A. — Mode opératoire et matériaux.
1° Milieux de culture et méthodes utilisés.
2° Matériaux.

B. — Résultats obtenus.
1° Evolution du nombre des bactéries au cours de la fabrication de la levure.
2° Examen quantitatif de la flore bactérienne de la levure pressée.
3° Examen qualitatif de la flore bactérienne des pains de levure.
4° Evolution des bactéries des pains de levure au cours de la fermentation des pâtes boulangères.

III. — Discussion et conclusion.

I. — INTRODUCTION

La levure industrielle pressée n'est pas microbiologiquement pure. Constituée en majorité de *Saccharomyces cerevisiae*, elle peut renfermer :

a) D'autres levures vraies, des *Torulas* et des pseudolevures (*Mycoderma* et *Monilia*).

b) Des moisissures communes telles que : *Mucor, Aspergillus, Penicillium, Fusarium* et *Oïdium*, en quantité extrêmement faible.

c) Des bactéries qui représentent numériquement le groupe de microorganismes étrangers à la levure, de beaucoup le plus important. D'après White (1), ces bactéries sont responsables de la plupart des accidents qui surviennent au cours de la fabrication, de la conservation et de l'uti-

Travail effectué avec la collaboration technique de Mlle L. Tallineau.

lisation de la levure pressée. Dans une mise au point récente, cet auteur (1) les classe en bactéries capables de provoquer la liquéfaction de la levure pressée (familles des *Micrococcaceae*, *Achromobacteriaceae* et *Enterobacteriaceae*), et en bactéries ayant à peu près les mêmes besoins métaboliques que les levures (dont beaucoup de *lactobacteriaceae* et d'*acetobacteriaceae*). Heinz (2), de son côté, met l'accent sur le rôle néfaste de certaines bactéries putréfiantes (*Proteus vulgaris*, *Bacterium fluorescens*) et sur le rôle protecteur des bactéries lactiques dans les pains de levure.

Le contrôle de la pureté microbiologique des levures industrielles et la numération des bactéries en présence de grandes quantités de levures, sont à l'origine de beaucoup de travaux et de publications (1-2). Les nombreuses méthodes utilisées, jusqu'à ces dernières années, pour dénombrer les microorganismes contaminant la levure, fournissent des résultats peu satisfaisants.

L'examen microscopique donne peu de renseignements, les cellules bactériennes pouvant être en très petit nombre par rapport à celles des levures et étant fréquemment adsorbées sur la surface de ces dernières ou masquées dans des agglomérats.

La séparation par centrifugation n'est jamais totale (4).

La numération sur milieux de culture sélectifs par additions de certains sels n'est pas sans inconvénient ; le bifluorure d'ammonium (5) a peu d'effet sur les cocci et inhibe la croissance des autres microorganismes ; le sulfate d'aluminium ou le thiocyanate de potassium n'entravent pas le développement de la levure ou gênent simultanément celui de la levure et des bactéries (3).

Les autres méthodes font appel à des milieux de culture privés de sucres fermentescibles par la levure, ne permettant donc pas le développement de celle-ci, mais il faut alors prendre grand soin de ne pas apporter de sucre fermentescible avec l'inoculum.

Récemment l'incorporation aux milieux de culture d'antifongiques tels que l'Actidione et la mycosubtiline a permis une séparation facile et un dénombrement complet de la flore bactérienne des levures (6). En effet, les bactéries sont beaucoup moins sensibles que les levures à l'action inhibitrice de l'Actidione et de la mycosubtiline.

Dans le domaine plus restreint des levures de boulangerie, les travaux publiés concernant la nature et le nombre des bactéries restent cependant peu nombreux. En dehors de la mise au point de White (1) sur les espèces bactériennes susceptibles de se trouver dans les levures pressées industrielles, on peut citer les travaux de Keilling (7) sur les bactéries sporulées des pains de levure employés en boulangerie. Le nombre de celles-ci est très variable de l'ordre de 3 à plus de 500 germes sporulés au gramme. Enfin Green et Gray (2) séparent les bactéries totales des levures en ajoutant de l'actidione dans les milieux de culture.

Ces auteurs trouvent un rapport nombre de bactéries/nombre de levures variant de 0,3 à 21,4 (8).

On possède également peu de renseignements sur l'évolution et le rôle des bactéries de la levure pressée au cours de sa conservation et de la fermentation panaire. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de reprendre, à l'aide des méthodes nouvelles faisant appel à des antibiotiques, ces divers aspects de l'étude des contaminations bactériennes dans les pains de levure de boulangerie utilisés en France.

II. — ÉTUDE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES BACTÉRIES PRÉSENTES DANS LES PAINS DE LEVURE

A. — MODE OPÉRATOIRE ET MATÉRIAUX

Pour isoler et décompter les levures et les bactéries des pains de levures, on a employé les méthodes de dénombrement en boîte de Pétri préconisées par GREEN et GRAY (2) en les modifiant quelque peu.

1° Milieux de culture et méthodes utilisés.

a) Pour isoler et dénombrer les microorganismes.

Dans tous les cas, on se sert d'un milieu « A » de composition simple :
cristomalt = 20 g (1) ;
gélose = 18 g ;
eau du robinet Q. S. — 1 000 ml,
et permettant un aussi bon développement des levures et des bactéries que le milieu de GREEN (2). A ce milieu, on ajoute un antibiotique choisi suivant la nature des microorganismes à isoler. Les cultures sont mises à incuber à 30°C pendant 48 heures.

α-Dénombrement des levures.

— dans les pains de levure frais le milieu A est utilisé tel quel ;

— dans les pains de levure avariés, le nombre de bactéries pouvant égaler ou dépasser celui des levures, le développement des bactéries est inhibé avec un mélange de Pénicilline et de Streptomycine ;

— (milieu B) à 10 ml du milieu A ajouter extemporanément 1 ml d'une solution aqueuse de Pénicilline-Streptomycine contenant par litre 200 mg de Pénicilline et 600 mg de Streptomycine.

(1) Le malt utilisé est le Cristomalt Jacquemaire.

β-Dénombrement des bactéries totales.

Le milieu de culture A est additionné d'Actidione pour inhiber le développement des levures : — (milieu C) à 10 ml du milieu A, ajouter extemporanément 2 ml d'une solution aqueuse d'Actidione à 250 mg par litre (1) (2).

b) **Milieux permettant à la fois de différencier et de dénombrer les différents types de bactéries.**

Bactéries Gram positif.

L'alcool phényléthylique inhibant la croissance des bactéries Gram négatif (9) sans entraver les développement des bactéries Gram positif, le dénombrement de ces dernières a été effectué sur milieu C après addition extemporanée d'1 ml de solution aqueuse d'alcool phényléthylique à 160 mg par litre, pour 10 ml de milieu (1).

Bactéries Gram négatif.

De faibles doses de Pénicilline (1 ml d'une solution de Pénicilline G à 300 mg par litre) ajoutées au milieu C (10 ml) permettent d'inhiber le développement des bactéries Gram positif sans gêner la croissance des bactéries Gram négatif.

Bactéries acidifiantes.

La production d'acide est décelée par incorporation au milieu A, avant stérilisation, de pourpre de Bromocrésol (à la dose de 0,0025 g par litre) qui de pourpre à pH 7 vire au jaune pH 5,4.

Les bactéries acidifiantes sont entourées d'un halo jaune ce qui permet de les compter aisément.

Bactéries liquéfiant la gélatine.

On peut utiliser une gélatine nutritive soit classique à l'extrait de viande, soit à l'extrait de malt (gélatine 100 g, extrait de malt 20 g, eau q. s. 1 000 ml) ; à 10 ml du milieu, on ajoute extemporanément 2 ml d'une solution aqueuse d'Actidione à 250 mg par litre.

(1) Les solutions de Pénicilline, de Pénicilline-Streptomycine, d'Actidione et d'alcool phényléthylique sont stérilisées à froid par filtration sur amiante. Les quantités à utiliser sont, ensuite, déterminées expérimentalement.

(2) Il est à noter que la dose d'Actidione nécessaire pour inhiber le développement de la levure dans le milieu A est très supérieure à celle indiquée par Whiffen (5) (seulement 10 microgrammes par ml).

Bactéries anaérobies et aérobies facultatives.

Les boîtes de Pétri contenant du milieu A, tel quel, ou additionné de pourpre de bromocrésol, sont placées, après ensemencement, en atmosphère de CO_2.

Bactéries sporulées.

La suspension microbienne est portée à 90°C au bain-marie pendant 20 mn (7) puis ensemencée sur milieu A.

Seuls les germes sporulés résistent à la sélection thermique et peuvent ensuite se développer sur milieu de culture.

Bactéries productrices de catalase.

Il suffit d'ajouter à la culture quelques gouttes d'eau oxygénée ; en présence de catalase, on observe un dégagement gazeux dû à l'O_2 libéré.

Le milieu A gélosé à base de malt, provoquant un très faible dégagement gazeux en présence d'H_2O_2, il est bon d'utiliser un milieu synthétique tel que celui de GREEN (3).

Bactéries capables de réduire les nitrates en nitrites.

Les bactéries sont cultivées sur eau peptonée et les nitrites caractérisés avec le réactif de GRIESS.

2° Matériaux.

Sauf pour l'examen des milieux de culture industriels de la levure, on a utilisé :

1° Des pains de levure frais du jour ou de 24 heures livrés dans leur empaquetage papier du commerce.

2° Des levures séchées :

— par séchage en « vermicelle » dans un courant d'air à 30°C, conservées dans boîtes aluminium et fraîchement fabriquées ;

— par dessiccation sous vide du produit dispersé dans une atmosphère à 30-25 p. 100 d'humidité relative, vers 0° + 4°C.

B. — RÉSULTATS OBTENUS

1° Évolution du nombre des bactéries au cours de la fabrication de la levure.

Pour tenter de fixer l'origine des bactéries des pains de levure, nous avons effectué, à diverses reprises, un certain nombre de prélèvements

aux stades successifs de fabrication dans une usine de la région parisienne. Les résultats obtenus sont fragmentaires et leur interprétation est délicate. En effet les prélèvements n'appartiennent pas toujours au même cycle de développement, et il n'est pas certain par ailleurs que les prélèvements effectués dans les grandes cuves (à la base ou au sommet) soient représentatifs de l'ensemble de la culture.

Cependant le tableau I fournit quelques indications intéressantes sur le sens de l'évolution du rapport : $\frac{\text{nombre de bactéries}}{\text{nombre de levures}}$ ou $\frac{B}{L}$

TABLEAU I.

Évolution du rapport B/L au cours de la fabrication de la levure

Stade de fabrication	Nombre de levures au g. ou au ml. $\times 10^7$	Nombre de bactéries au g. ou au ml.	B/L p. 100 $\times 10^{-3}$
Génération 1			
fabrication A	22	83	378
Génération 2			
fabrication A	0,7	90	1,6
fabrication B	36	450	125
Génération 3			
fabrication A	98	$0{,}024.10^7$	24
fabrication B	200	$0{,}0103.10^7$	5
Génération 4			
fabrication A			
avant séparation	87	$8{,}3.10^7$	9.500
après séparation	350	$9{,}3.10^7$	2.570
fabrication B			
avant séparation	171	$10{,}4.10^7$	6.090
	115	142.10^7	126.000
après séparation	55	$0{,}7.10^7$	1.270
petite eau	0,015	40.10^7	266.666
Génération 5			
fabrication B			
avant séparation	280	$2{,}3.10^7$	8.200
après séparation	400	$2{,}6.10^7$	0,650
petite eau	15	$3{,}7.10^7$	24.700
Liquide entrée tambour			
fabrication A	6	$0{,}06.10^7$	100
fabrication B	2,80	23.10^7	82.000
Pellicule tambour			
fabrication A	830	13.000	0,1
fabrication B	550	12.10^7	2.150
Pollutions bactériennes apportées par les matières premières			
Mélasse		< 1	
Eau		3	
Phosphate		< 1	
Sulfate		—	
Air filtré (500 litres)		Sur totalité	
Atmosphère des locaux (20′ d'exposition d'une boîte de Pétri		de 200 à 5.000	

Ce rapport va en augmentant du début de la fabrication jusqu'à la fin des différents cycles de multiplication avant séparation.

Les séparations par centrifugations et lavages permettent d'éliminer une grande partie des bactéries qui ne se déposent pas avec les levures et sont entraînées dans les eaux de lavage. Après chaque séparation le rapport B/L diminue de 5 à 10 fois. Lors du dernier lavage qui est particulièrement efficace B/L diminue de 40 à 100 fois. Il serait intéressant de savoir dans quelle mesure des lavages supplémentaires permettraient de diminuer encore la valeur de ce rapport.

Dès les premiers stades industriels, les bactéries sont présentes dans les cultures de levures. La pureté de la souche ne paraissant pas en cause, il est vraisemblable que l'apport de bactéries, bien que très faible (tableau I), se fait soit par les matières premières y compris l'eau et l'atmosphère des locaux, soit par le matériel. En effet, malgré tous les soins apportés pour travailler dans des conditions optima, il est pratiquement impossible au stade industriel d'éliminer complètement la présence des bactéries. Il suffit d'un ensemencement minime pour que celles-ci se multiplient en même temps que la levure si le milieu leur est particulièrement favorable.

TABLEAU II.

Nombre de microorganisme par G. de substance humide

Origine	Date	Teneur en eau p. 100	Levures $\times 10^8$	Bactéries $\times 10^6$	Bactéries acidifiantes $\times 10^6$	Bactéries $G^+ \times 10^6$	Bactéries G^-	Bactéries sporulées	Bactéries liquéfiantes	$\frac{B}{L}$ p. 100
1	28-4-56		64	24						0,37
	9-5-56		65	26						0,4
	14-5-56		85	150						1,76
	23-5-56		65	10	10	10	< 1 000	30	0	0,15
	28-5-56		66	13,5						0,2
	14-11-56	70,5	85	0,6						0,071
	18-7-56		112	45	45	45	3 000	160	1 000	0,4
	15-4-56		85	0,14						0,0016
2	7-5-56		86	135						1,57
	14-5-56		84	6 000						71,5
	23-5-56		95	1 380	1 380	1 300				14,5
	28-5-56		61	1 400						23
	14-11-56	70	100	13						0,13
	18-7-56		69	6	6	6	100 000	300	0	0,08
3	9-5-56		80	530						6,6
	14-5-56		77	1 000						13
	23-5-56		82	120	120	120	60 000	200	1 000	1,4
	14-11-56	70,5	98	230						2,35
4	27-4-56		51	440						8,6
	23-5-56		88	580			< 1 000	40	1 000	6,6
	14-11-56	70,75	110	2 150						19,3
5	7-5-56		45	100						2,22
	9-5-56		83	78						0,94
	14-5-56		69	49						0,71
			58	82		82		< 20		1,41
	14-11-56	67,5	100	3,2						0,032
6	14-11-56	67	134	75						0,56
7	7-5-56		91	350						3,8
	14-5-56		81	450						5,55

2° Examen quantitatif de la flore bactérienne des pains de levure.

a) Pains de levure frais.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau I.

Le rapport nombre de bactéries totales/nombre de levures p. 100 ou B/L varie de 0,002 à 71,5 p. 100.

Ces grandes différences ne sont pas reliées aux variations des teneurs en eau des pains de levure(1), mais à l'origine de ceux-ci et pour une même provenance à la date de fabrication. Il n'y a pas, non plus, de relation directe entre la valeur de B /L et l'indice de pousse Berlinoise ou les résultats de l'épreuve de conservation (2).

b) Au cours de la conservation des pains de levure à différentes températures et en atmosphère de différentes tensions de vapeur d'eau (tableaux III-IV-V, graphiques 1 et 2).

Dans les pains conservés, entre 0 et 4°C en chambre froide, dans leur empaquetage d'origine, le nombre de germes vivants croît lentement durant les 3 premières semaines. La valeur du rapport B/L varie peu (tableau III).

TABLEAU III.

Conservation des levures en chambre froide

Origine	Durée de conservation en Semaine	Nombre de microorganismes par g. de substance humide		$\frac{B}{L}$ p. 100
		Levures x 10^8	Bactéries x 10^6	
Ia	0	64	24	0,37
	4	70	22,5	0,32
Ib	0	112	45	0,4
	1	110	50	0,45
	4	70	35	0,5
Ic	0	66	13,5	0,2
	1	71	26	0,36
2a	0	66	10,4	0,16
	3	100	36	0,36
2b	0	61	1 400	23
	1	80	1 670	21
3	c	50	440	0,88
	4	40	1 120	2,8

Pour préciser les conditions de conservation, des pains de levure sous empaquetage papier du commerce ont été stockés à 0-22-25 et 30°C,

(1) La détermination de la teneur en eau a été effectuée par passage à l'étuve à 130°C pendant 2 heures.

(2) « Pousse Berlinoise » méthode empirique des professionnels utilisée pour l'appréciation du pouvoir fermentaire des levures (le gonflement des pâtons est fonction inverse de la vitesse de fermentation). L'épreuve de conservation est un contrôle de la tenue et de l'odeur des pains de levure conservés à 35°C pendant 6 jours.

dans des bocaux étanches en présence d'eau ou de solutions d'acide sulfurique de titres différents, réalisant ainsi des tensions de vapeur d'eau relatives constantes de 100-85-70 et 60 p. 100.

L'atmosphère des bocaux est renouvelée tous les deux jours par insufflation d'air ayant même tension de vapeur d'eau relative.

Des dosages effctués en surface et au cœur des pains de levure ont permis de constater qu'à ces humidités relatives la teneur en eau de la levure sous empaquetage varie peu. A 60 et 70 p. 100 d'humidité relative, elle diminue légèrement et passe de 72,4 à 69 et 70 p. 100 en un mois ; à 85 et 100 p. 100 d'humidité relative, elle augmente un peu et passe de 72,5 à 73 et 74 p. 100. A 0°C, le nombre de microorganismes reste sensiblement constant pendant les premières semaines, puis levures et bactéries diminuent au cours de la quatrième semaine, B/L ne variant pratiquement pas, comme dans l'essai sur pain entier en chambre froide.

A 22°C, le nombre de cellules de levures augmente légèrement tandis que celui des bactéries est multiplié par 15.

Vers 25-27°C, le nombre de levures passe par un maximum la première semaine, pour diminuer ensuite alors que celui des bactéries augmente continuellement pendant la durée de l'essai ; le rapport B/L passe à 500.

A 30°C les levures diminuent progressivement et les bactéries augmentent très sensiblement jusqu'à la troisième semaine pour diminuer ensuite (tableaux IV et V — graphiques 1 et 2).

c) **A l'état sec** (voir tableau VI).

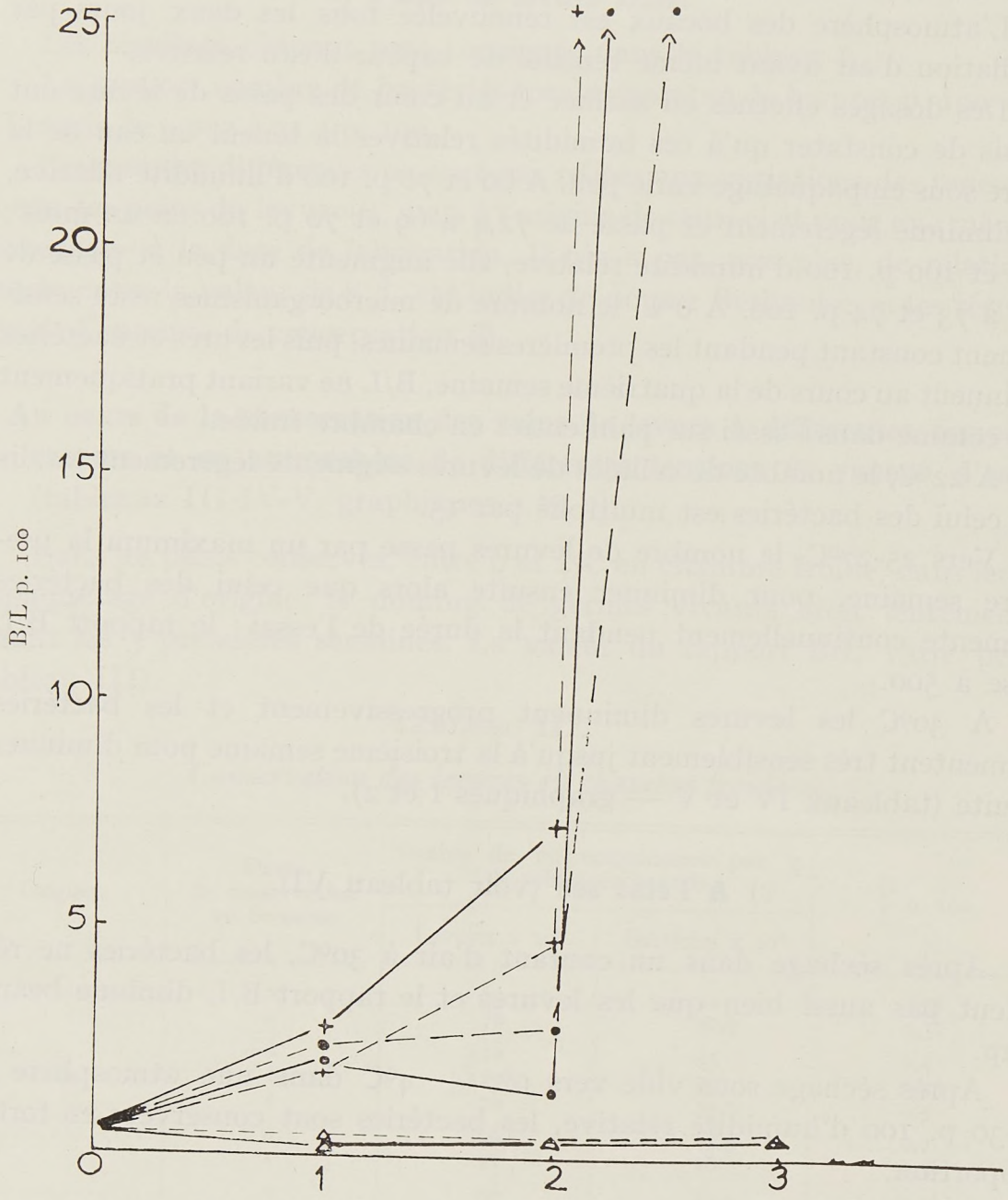
Après séchage dans un courant d'air à 30°C, les bactéries ne résistent pas aussi bien que les levures et le rapport B/L diminue beaucoup.

Après séchage sous vide vers 0°, + 4°C dans une atmosphère à 25-30 p. 100 d'humidité relative, les bactéries sont conservées en forte proportion.

3° Examen qualitatif de la flore bactérienne des pains de levure.

Les modes de caractérisation indiqués précédemment ont permis de montrer qu'au moins 90 p. 100 des bactéries sont des bâtonnets ou des coccis Gram positif formant de très petites colonies sur les milieux gélosés. Elles sont productrices d'acide et coagulent le lait. Elles ne sont pas anaérobies strictes, ne réduisent pas les nitrates et possèdent peu ou pas de catalase.

Dans l'ensemble elles présentent donc les caractères *des bactéries*



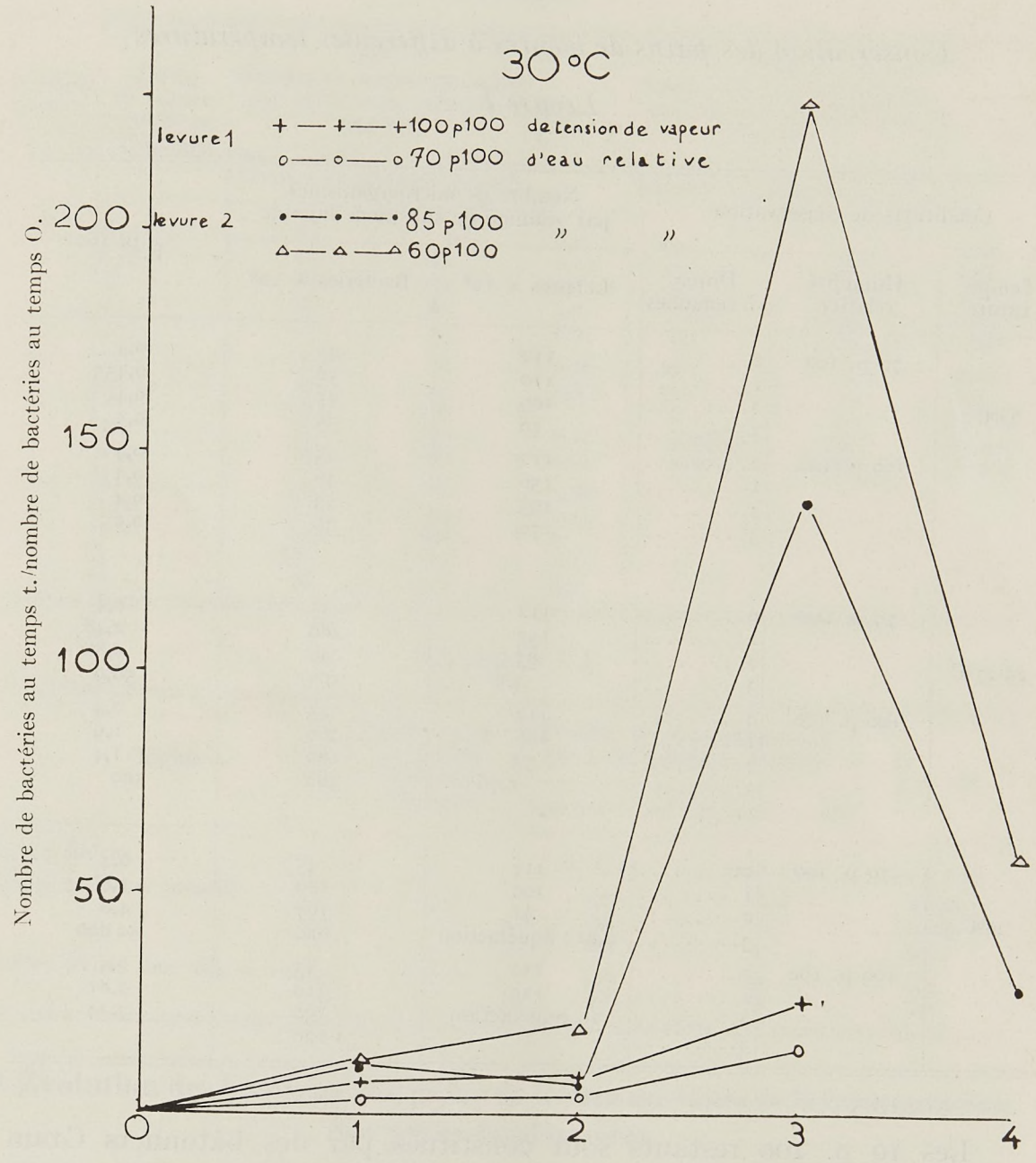
GRAPHIQUE 1. — Levure 1.

70 p. 100 de tension de vapeur d'eau relative :

+ — — — + 0 °C ; o — — — o 25 °C ; △ — — — △ 30 °C

100 p. 100 de tension de vapeur d'eau relative :

— + — — + — 0 °C ; — o —— o — 25 °C — △ —— △ — 30 °C


30°C
levure 1
+ — + — + 100 p 100 de tension de vapeur
o — o — o 70 p 100 d'eau relative
levure 2
• — • — • 85 p 100 " "
△ — △ — △ 60 p 100
Nombre de bactéries au temps t./nombre de bactéries au temps 0.
200
150
100
50
0
1
2
3
4
Durée de conservation en semaines

GRAPHIQUE 2.

lactiques, mais appartiennent à des espèces différentes suivant l'origine des pains de levure.

Tableau IV

Conservation des pains de levures à différentes températures

Levure I

Conditions de conservation			Nombre de microorganismes par gramme de substance humide		$\frac{B}{L}$ p. 100
Température	Humidité relative	Durée en semaines	Levures × 10^8	Bactéries × 10^6	
0°C	70 p. 100	0	112	45	0,4
		1	110	50	0,455
		2	109	45	0,41
		3	70	35	0,5
	100 p. 100	0	112	45	0,4
		1	156	46	0,3
		2	105	43	0,4
		3	70	36	0,5
25-27°C	70 p. 100	0	112	45	0,4
		1	153	380	2,48
		2	83	240	2,88
		3	3,5	200	56,9
	100 p. 100	0	112	45	0,4
		1	186	360	1,9
		2	75	180	1,4
		3	0,76	380	500
30°C	70 p. 100	0	112	45	0,4
		1	100	180	1,8
		2	41	197	4,8
		3	0,013 liquéfaction	680	52 000
	100 p. 100	0	112	45	0,4
		1	110	310	2,81
		2	19 liquéfaction	330	7,34
		3		1 120	

Les 10 p. 100 restants sont constitués par des bâtonnets Gram négatif non aérobies stricts. On y rencontre très peu de bactéries liquéfiantes et de bactéries sporulées (on en a dénombré de 300 à moins de 20 par g de substance humide).

Ces proportions varient peu au cours des différents modes de conservation qui ont été examinés. Cependant, lorsque la levure est séchée dans un courant d'air vers 30°C, du fait de la sélection thermique et hydrique, ces proportions sont sensiblement modifiées au profit des bactéries chromogènes et liquéfiantes qui sont alors plus résistantes que les bactéries lactiques.

TABLEAU V

Conservation des pains de levures a différentes températures
Température de conservation
Levure 2

Humidité relative p. 100	Durée de conservation en semaines	22°C Nombre de microorganismes par gramme de substance humide		B/L p. 100	30°C Nombre de microorganismes par gramme de substance humide		B/L p. 100
		Levures × 10^8	Bactéries × 10^6		Levures × 10^8	Bactéries × 10^6	
60	0.....	69	6,1	0,08	69	6,1	0,08
	1.....	64	61	0,95	53	66	1,3
	2.....	140	230	1,6	55	120	2,2
	3.....	87	320	3,7	1,25	1 400	1 120
	4.....	110	83	0,7	0,5	374	748
85	0.....	69	61	0,08	69	6,1	0,08
	1.....	56	93	1,66	44	64	1,5
	2.....	120	650		5	41	8,2
	3.....	87	740	8,51	0,00063	850	134 000
	4.....	95	960	10,1	0,0005	180	36 000
100	0.....	69	61	0,08			
	1.....	51	74	1,45			
	2.....	100	600	6			
	3.....	125	720	5,8			
	4.....	98	950	9,6			

TABLEAU VI

Origine	Teneur en eau p. 100 de substance humide	Nombre de microorganismes par g de substance humide		B/L p. 100
		Levures × 10^8	Bactéries × 10^6	
Levure fraîche.....	70	64 à 85	13 à 150	0,2 à 1,76
Levure séchée à 30-40°C.....	11,7-8	230	6,6	0,028
		175	0,7	0,004
		150	14	0,01
Levure séchée sous vide à 0-4°C..	10 à 12	120	49	0,4
		168	70	0,4

4° Évolution des bactéries des pains de levure au cours de la fermentation des pâtes boulangères.

Dans une pâte boulangère à 1 p. 100 de levures, la quantité de bactéries apportée par une farine courante est faible (de l'ordre de 2 à 100 10^3 par gramme avec une moyenne de 20 à 30 10^3) par rapport à celle fournie par la levure (1,4 10^3 à 60 000 10^3 par 0 g.01 de levure pressée avec une moyenne voisine de 3 000.10^3) (tableau VII).

Le nombre de bactéries introduites avec l'eau et le sel est presque toujours négligeable si l'on s'en réfère au tableau I. Dans des conditions optima de préparation des pâtes, c'est-à-dire sans préjuger de l'apport extérieur possible au cours de la fabrication, il est permis de dire que la

majeure partie de la microflore de la pâte est constituée, levures mises à part, par les bactéries accompagnant celles-ci. Ce fait a d'autant plus d'intérêt que les bactéries des pains de levure se multiplient parallèlement à la levure (1) au cours de la fermentation panaire, ainsi qu'en témoignent les résultats consignés dans le tableau VIII.

TABLEAU VII

Population bactérienne d'une pâte boulangère

Composants de la pâte	Quantités introduites	Nombre de microorganismes apportés ·
Farine	1 g	$2 \cdot 10^3$ à $100 \cdot 10^3$ par g avec une moyenne de $20 \cdot 10^3$ à $30 \cdot 10^3$
Levure pressée	0,01 g	$1{,}4 \cdot 10^3$ à $60\,000 \cdot 10^3$ avec une moyenne voisine de $3\,000 \cdot 10^3$
Eau	0,6 g	négligeable
Sel	0,02 g	négligeable

TABLEAU VIII

Par gramme de pâte fraîche

Nombre de microorganismes au temps 0		Nombre de microorganismes après 6 h de repos à 25°C		Augmentation p. 100 du nombre de Bactéries
Levures × 10^6	Bactéries × 10^6	Levures × 10^6	Bactéries × 10^6	
	0,86		1,062	23,4
	2,6		3,2	23
	0,175		0,35	100
	0,19		0,7	268
	0,38		1,2	216
	0'12		0,28	133
	0,106		1,2	1 033
70	0,183	81	0,425	125
51	0,625	41	0,704	12
44,5	0,41	45,7	0,455	11
55	1,4	68	1,4	0
55	1,9	30	4,5	135
64	3,6	64	20,5	470

Sur des pâtes ensemencées uniquement de bactéries isolées des pains de levure, on retrouve également au bout de 6 h. d'incubation vers 27°C un taux d'augmentation allant de 200 p. 100 à 2 000 p. 100. Ces pâtes présentent en outre dans ces conditions une légère augmentation d'acidité et un arôme agréable.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le nombre de bactéries présentes dans les pains de levure est très variable d'un pain à l'autre ; mais toujours important, de 1.10^7 à 6.10^9 par gramme de produit humide. Chiffres qui sont du même ordre de

(1) Il semble y avoir dans les pâtes une population optimum de levures de l'ordre de 2 p. 100 (11).

grandeur que ceux ndiqués par GREEN et GRAY (8) qui ont dénombré de 6.10^7 à 3.10^9 bactéries par gramme de pain de levure.

Ces bactéries sont en majeure partie (pour 90 p. 100) Gram positif et appartiennent au groupe des bactéries lactiques.

Au cours de la fabrication, l'apport de bactéries est vraisemblablement dû aux matières premières et au matériel utilisé. Le milieu de culture à base de mélasse, peuplé de levures, est en quelque sorte sélectif vis-à-vis des différents germes bactériens susceptibles de le polluer et offre la conjoncture la plus favorable aux bactéries lactiques qui occupent rapidement le terrain. Les séparations par centrifugation et lavage permettent d'éliminer une grande partie de cette flore.

Il n'existe pas de rapport entre le nombre de bactéries trouvées par gramme de levure fraîche et les résultats obtenus après les épreuves de conservation utilisées pour le contrôle des levures. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que la durée de ces épreuves de conservation est de 6 jours à 35°C, alors que le nombre de bactéries dans les pains de levure ne commence à augmenter d'une façon notable qu'après 2 semaines d'incubation à 30-32°C. De plus d'après HEINZ (2) la flore lactique acidifiante jouerait un rôle protecteur vis-à-vis de la levure.

D'une façon générale, au cours de la conservation des pains de levure pressée, le rapport $\frac{\text{nombre de bactéries}}{\text{nombre de levures}}$ ne cesse de croître, et ceci d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. La vitesse d'évolution varie également avec le type de bactéries lactiques.

Il est intéressant de constater que la microflore des pains de levure, constituée en majorité de bactéries lactiques, représente l'essentiel des bactéries des pâtes boulangères, abstraction faite des apports extérieurs.

Les pains de levure, en fait, représentent donc une association naturelle, levures bacilles lactiques dans des proportions qui peuvent être importantes et parfois du même ordre que celles que l'on retrouve avec certaines fabrications spéciales de mélange levures-bacilles lactiques utilisées à l'étranger.

Les travaux effectués sur les levains et notamment ceux de CASTELLI (12) et de l'Ecole Allemande (13) ont mis en évidence l'importance des bacilles acidifiants associés aux levures dans la panification sur levain.

Il convient d'examiner plus en détail le rôle des différentes bactéries lactiques des pains de levure sur l'acidité, les « qualités plastiques » et l'arôme des pâtes, en vue d'isoler les souches les plus favorables. On peut en outre se demander dans quelle mesure, une part des modifications des « qualités plastiques » des pâtes, attribuées aux levures, ne revient pas aux bactéries qui les accompagnent.

Nous remercions M. GUILBOT pour les conseils qu'il nous a donnés au cours de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) WHITE (J.). — Microbiological control of yeast. Growth Process, Wallerstein. Lab. comm. XIII, **42**, 267-280, 1950. — Yeast Technology. London, 226-242, 1954.
(2) HEINZ (L.). — Mikroorganismen, welche die Qualität der Bäckerhefe ungünstig beeinflussen Mitt. versuchs Garungsgew, nº 7-8. Jul-Aug, 91-94, 1954.
(3) GREEN (S. R.) and GRAY (P. P.). — A differential procedure applicable to bacteriological Investigation in Brewing, Wallerstein Lab. comm. XIII, **43**, 357-366, 1950.
(4) SHIMWELL (J. L.). — Wallerstein Lab. Comm. 8, **23**, 1945, cité par GREEN and GRAY.
(5) CLAUSSEN (N. H.). — Compte rendu Trav. Lab. Carlsberg 6 : 64, 1903 — cité par GREEN and GRAY.
(6) WHIFFEN (A. J.). — The production, Assay and Antibiotic Activity of Actidione, an Antibiotic from Streptomyces Griseus. *J. Bact.* 56 ; **283**, 1948.
(7) KEILLING (J.), CASALIS (J.), GLASER (I.) et MOURO (N.). — Anomalies bactériennes en Panification. Le Pain. Les journées scientifiques du C. N. C. E. R. N. A., 199-216, 1948.
(8) GREEN (S. R.) and GRAY (P. P.). — A differential Procedure for bacteriological studies useful in the fermentation industry. Wallerstein Lab. comm. XIV, **47**, 289-295, 1951.
(9) STRANDSKOY (F. B.), BRESCIA (J. A.) and BOCHELMANN (J. B.). — The application of selective bacteriostasis to brewery bacteriology. Wallerstein Lab. comm. XVI, **52**, 31-37, 1953.
(10) POISSON (J.) et GUILBOT (A.). — Microflore des farines françaises, composition et évolution. Annales Technologie I. N. R. A., nº 1, 63-85, 1957.
(11) GEOFFROY et LABOUR (G.). — Étude de quelques levures hautes pressées destinées à la Boulangerie. *Bull. Anc. Elèves E. F. M.*, nº 57, p. 66, 1937.
(12) CASTELLI (T.). — Ricerche sui lieviti della panificazione casalinga. Giornale di Biologia Industriale, Agraria ed Alimentare. Anno VII, nº 3, Bologna-Maggio XV, 1937.
(13) HEINZ (L.) et KLANSHOFER (H.). — Etudes sur la flore du levain. Mitt. Versuchs Garungsgew, nº 9-10, sept.-oct., p. 105, 1952.

ÉVOLUTION DE LA VITAMINE C DANS LE RAISIN CONSERVÉ EN FRIGORIFIQUE

PAR

Mlle A. OURNAC

Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne (Aude).

L'emploi de l'entreposage frigorifique pour prolonger aussi longtemps que possible la consommation des fruits à l'état frais est une pratique courante. Cette pratique répond à un double besoin : économique et physiologique.

Mais tous les fruits ne se comportent pas de la même manière aux basses températures, ils peuvent subir des altérations plus ou moins profondes qui modifient leurs caractères morphologiques, leur consistance, leur saveur, et surtout leur valeur nutritive.

Le raisin offre la particularité d'être stocké à maturité contrairement à d'autres fruits (pommes, bananes, par exemple) que l'on stocke avant le stade de maturité gustative. De ce fait, et étant donné la fragilité de sa pellicule, le raisin est particulièrement délicat à conserver. Il est intéressant de suivre son évolution au cours de la conservation en frigorifique.

De tous les constituants du raisin nous avons choisi la vitamine C, non pour sa dose initiale, car on sait que le raisin est pauvre en cet élément, mais parce que le comportement de cette vitamine permet de classer les fruits au point de vue conservation. On sait en effet que les résultats sont très variables suivant les fruits et les légumes.

— Dans 2 variétés de pommes entreposées entre 0 et + 1°C, dans une atmosphère de 78 à 82 p. 100 d'humidité, on a observé une perte de 39 à 42 p. 100 après 6 mois (1).

— Les groseilles rouges et blanches peuvent être conservées à 0° pendant 4 semaines, au cours de l'entreposage, les pertes en vitamine C sont de l'ordre de 25 p. 100 (2).

— A 0° les pertes de vitamine C sont pratiquement nulles pour des choux conservés 5 mois (3).

— Il en est de même pour des brocolis après 24 jours de stockage (4).

Protocole des essais.

On a choisi un cépage à fruit blanc, le Servant, et un à fruit rouge, le Valdiguié. Ces cépages proviennent du vignoble de l'I. N. R. A. (Pech-

Rouge) situé en bordure de la mer. Ils étaient les seuls, à l'époque tardive où les essais ont été entrepris, à être restés sains sur la souche. Ils représentent donc des variétés possédant des possibilités naturelles de conservation. En opérant sur 2 variétés distinctes on se rendra compte si leur comportement est identique. Dans le cas contraire, on pourra en retirer des conséquences technologiques intéressantes.

Les fruits ont été cueillis très mûrs, ils présentaient des indices de maturation exprimés par le rapport $\frac{S}{A}$:

$$\frac{\text{Sucres (g/l)}}{\text{Acidité totale (acide tartrique g/l)}}$$

égaux à 25 pour le Servant et à 32 pour le Valdiguié.

Ils ont subi un temps de transport très court, 1/2 heure environ, et ont été immédiatement après, étalés sur des plateaux et placés dans la chambre froide.

La température a été maintenue entre 0 et + 3°C, température légèrement supérieure à la température de congélation du raisin située entre — 4° et — 2°C ; le degré hygrométrique est resté voisin de 80 p. 100, une humidité aussi élevée que possible est recommandée.

A intervalles réguliers un lot de raisin était prélevé, et on déterminait séparément la teneur en vitamine C de la rafle, du jus et des constituants solides du grain : pulpe + pellicule.

Le dosage était effectué selon la méthode de Roe et Oesterling, adaptée par « The Association of Vitamin Chemist Inc » (5). Elle est basée sur l'oxydation de l'acide ascorbique en déhydroascorbique suivie de précipitation par la 2-4 dinitrophénylhydrazine, dissolution du précipité obtenu et évaluation de la couleur formée.

On obtient ainsi la somme : acide ascorbique + acide déhydroascorbique.

Tableau I

Servant

Date des prélèvements	Sucre en g/l	Acidité totale en meq./l	Sucre en g par 100 grains	Acidité totale par 100 grains
4 Octobre 1956 (Cueillette)	170	88	57,8	30
15 Octobre 1956	167	90	59,3	32
30 Octobre 1956	172	86	51,6	25,8
20 Novembre 1956	173	70	55,7	22,5
11 Décembre 1956	199	70	59	20,8
8 Janvier 1957	187	78	57	23,8
11 Février 1957	187	72	47,4	18,3
8 Mars 1957	175	80	45,5	20,8
Perte p. 100		9	21	30

Le dosage séparé des 2 formes, réduite et oxydée, de la vitamine, serait intéressant à réaliser, il est possible qu'une seule des 2 formes varie.

TABLEAU II

Servant vitamine C en mg.

Date des prélèvements	Dans le jus par litre	Dans le jus par 100 grains	Dans les constituants solides de 100 grains	Dans 100 g. de constituants solides	Dans la rafle par 100 grains	Dans 100 g. de rafle	Dans 100 grains entiers	Dans 1000 g. de fruit
4 Octobre 1956 (Cueillette)....	66,3	22,5	12,2	15,2	3,76	49,5	34,7	78
15 Octobre 1956.	45	16	10	7,1	1,62	45	26	51
30 Octobre 1956.	45	13,5	7,5	9,4	1,04	49,5	21	52
20 Novembre 1956	44	14,2	5,5	7,2	0,9	33,3	19,7	41
11 Décembre 1956	43	12,2	4,5	5	1	26	17,3	42
8 Janvier 1957.	29	8,9	3,2	4	1,04	16	12,0	29
11 Février 1957 .	20,5	5,2	2,2	2,3	0,57	10,9	7,4	20
8 Mars 1957....	19	4,9	2,0	2,9	0,53	23	6,95	20,5
Perte p. 100.....	71	78	83	81	86	82	80	75

L'extraction de la vitamine à partir des corps solides était réalisée au moyen d'acide métaphosphorique. Les détails opératoires de cette technique sont exposés dans une publication antérieure (6).

TABLEAU III

Valdiguié

Date des prélèvements	Sucre en g./l.	Acidité totale en meq./l.	Sucre en g. par 100 grains	Acidité totale par 100 grains
9 Octobre 1956 (Cueillette).....	196	78	45	17,9
22 Octobre 1956.....	196	86	44,5	19,5
8 Novembre 1956.....	204	82	41,6	16,7
23 Novembre 1956.....	216	88	45	18,4
11 Décembre 1956	210	92	42	18,6
8 Janvier 1957	229,5	82	43	15,6
1er Février 1957	227	78	40,6	13,9
8 Mars 1957.....	242,5	76	35,4	11,1
Perte p. 100.....			22	38

Les résultats sont exprimés en milligrammes par litre de jus, par 100 grains et par 100 g de matière fraîche. Ils sont groupés dans les tableaux I, II, III, IV, et représentés graphiquement par les courbes nº I et II.

Les essais ont duré 5 mois, au-delà de ce délai la proportion de fruits en mauvais état était trop importante pour permettre de nouveaux prélèvements.

Interprétation des résultats.

Un premier examen des résultats permet de constater :

— Une perte de poids du fruit et une concentration du jus, ce qui est bien connu.

— Une diminution générale de la vitamine C contenue dans le raisin.

— Une différence dans le comportement des deux cépages au point de vue vitesse et pourcentage de disparition suivant le constituant considéré.

TABLEAU IV

Valdiguié vitamine C en mg.

Date des prélèvements	Dans le jus par litre	Dans le jus par 100 grains	Dans les constituants solides de 100 grains	Dans 100 g. de constituants solides	Dans la rafle par 100 grains	Dans 100 g. de rafle	Dans 100 grains entiers	Dans 1000 g. de fruit
9 Octobre 1956 (Cueillette) ...	70	16,1	4,2	11	1,67	50,6	20,3	71
22 Octobre 1956.	35	8	6,3	11,6	1,2	34,2	14,3	47,6
8 Novembre 1956	32	6,5	7,6	13,1	0,5	21	14,1	50
23 Novembre 1956	37,5	7,9	17,2	13,6	0,8	40,2	15,1	54
11 Décembre 1956	27	5,5	4,5	10	0,6	28	10	38
8 Janvier 1957.	29	5,5	7	15	0,3	16,1	12,5	49,6
1er Février 1957	20	3,6	4	7,1	0,5	19,1	7,6	30,5
8 Mars 1957....	20	2,9	6,6	8,7	0,4	12,4	9,5	41
Perte p. 100.....	71	81	0	20	75	75	53	42

Nous examinerons successivement l'évolution de l'acide ascorbique dans le fruit entier et dans chaque élément constitutif.

1° Dans le grain entier.

Cette valeur représente les phénomènes globaux d'évolution de la vitamine du fruit indépendamment des effets de dilution ou de concentration qui peuvent se produire.

Elle montre une perte plus rapide et plus importante pour les raisins blancs que pour les raisins rouges.

Après 5 mois de conservation, le Valdiguié renferme encore la moitié de sa vitamine initiale, tandis que le Servant a conservé tout juste le 1/5.

2° Dans le jus.

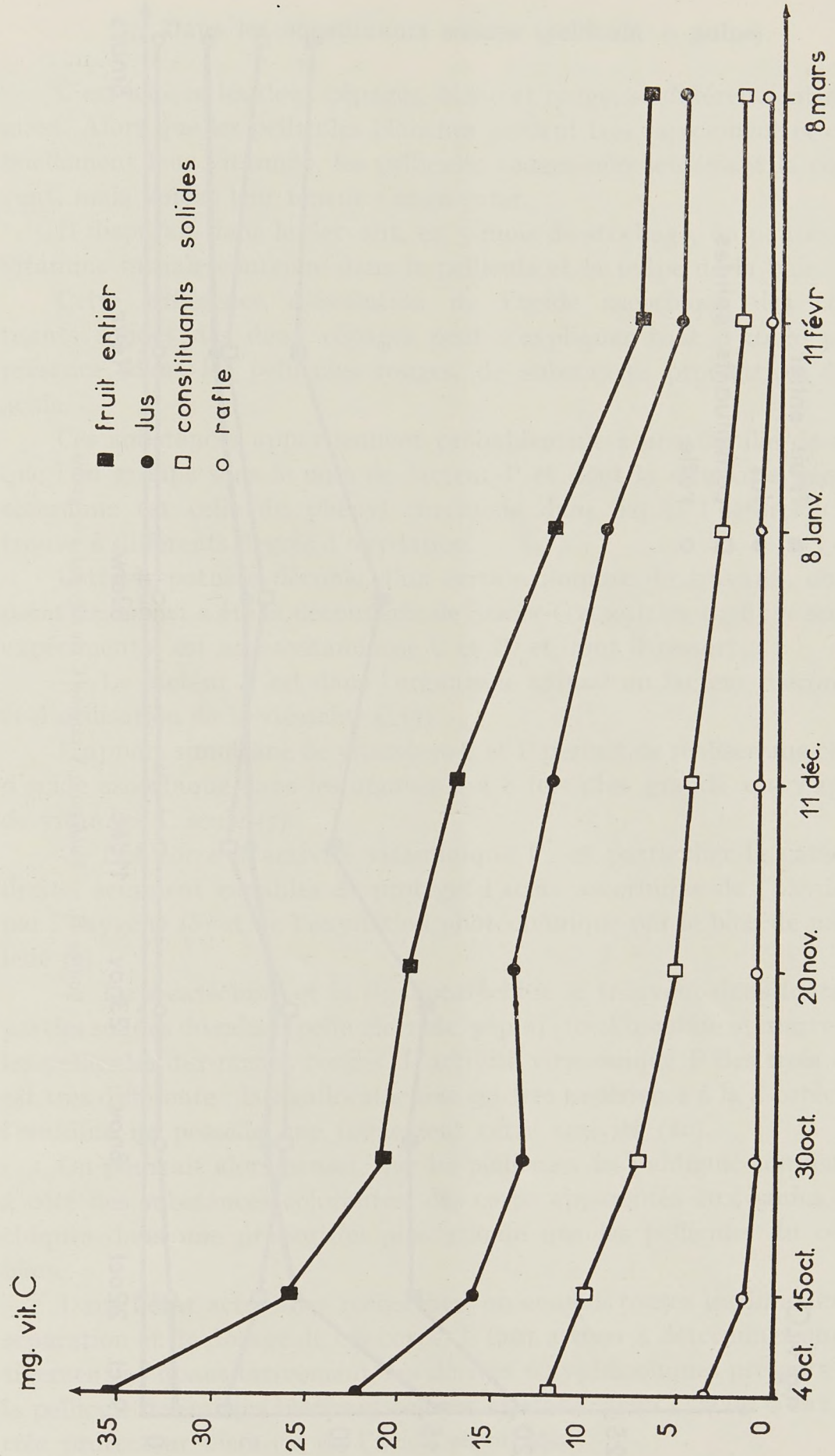
Considérons d'abord la teneur ramenée au jus de 100 grains, nous éliminons ainsi l'influence de la concentration dont le jus a été le siège : il se produit pour les deux cépages une grosse chute au cours des 12 premiers jours de réfrigération :

— 31 p. 100 de vitamine disparaissent chez le Servant ;

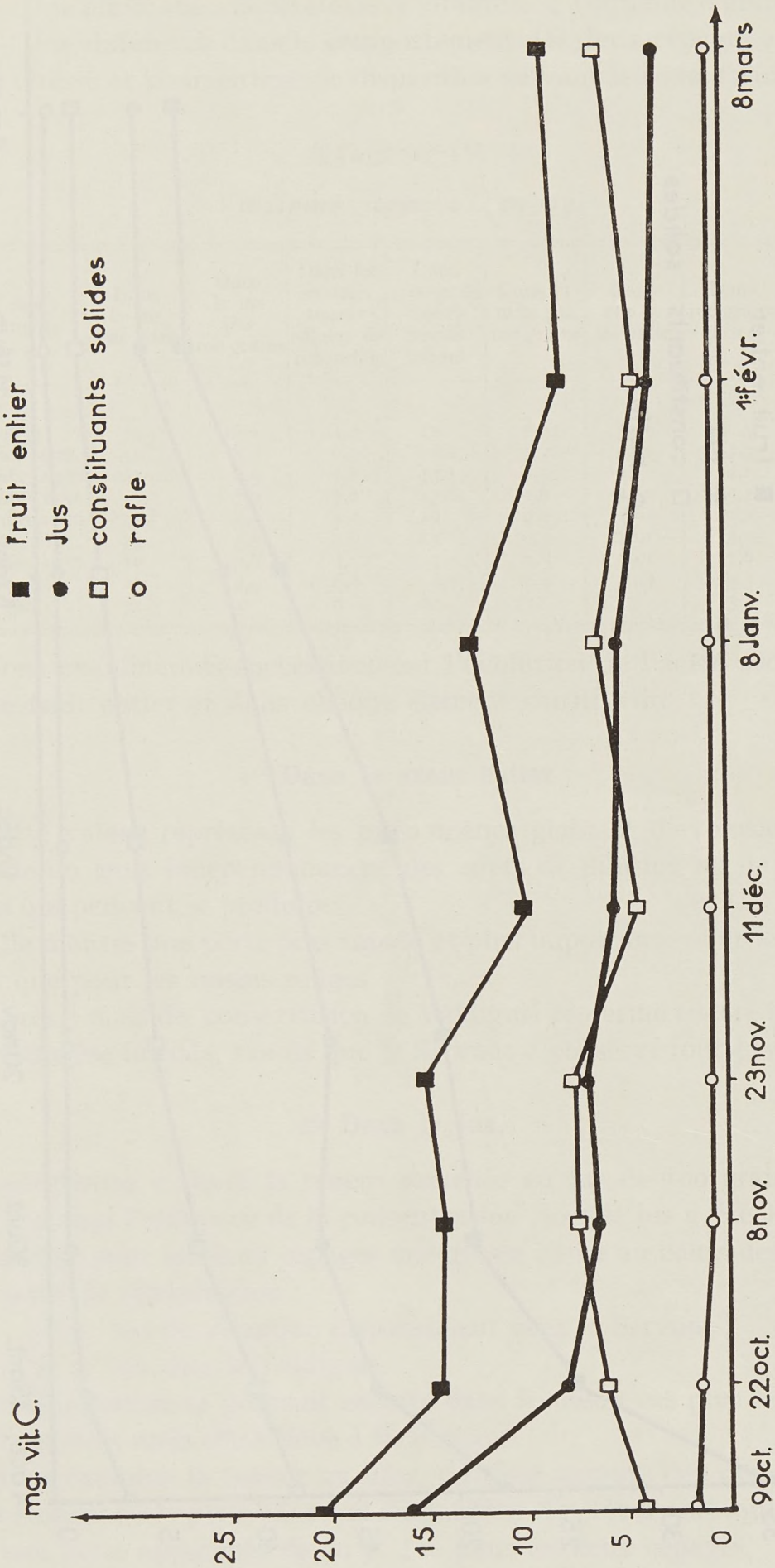
— 50 p. 100 chez le Valdiguié.

La diminution se poursuit ensuite dans les deux cas plus lentement et au bout de 5 mois elle s'élève à 80 p. 100.

Si on examine la teneur au litre, on tient compte des deux phénomènes simultanés : perte d'eau et disparition d'acide ascorbique, on observe une perte apparente de 70 p. 100 pour les deux cépages.



Courbe I. — *Servant* : Vitamine C en mg. par 100 grains.



Courbe II. — *Valdiguié* : Vitamine C en mg. par 100 grains.

3° Dans les constituants solides (pellicule + pulpe).

C'est ici que les deux cépages, blanc et rouge, se différencient nettement. Alors que les pellicules blanches perdent très rapidement et continuellement leur vitamine, les pellicules rouges non seulement la conservent, mais voient leur teneur s'augmenter.

Il disparaît dans le Servant, en 5 mois de stockage, 80 p. 100 de la vitamine initiale contenue dans la pellicule et la pulpe de la baie.

Cette différence d'évolution de l'acide ascorbique des constituants solides des deux cépages peut s'expliquer tout d'abord par la présence, dans les pellicules rouges, de substances protectrices de cet acide.

Ces substances appartiennent probablement à une famille de corps que l'on groupe sous le nom de facteur P et dont la structure générale commune est celle du phényl chromone dans lequel l'hétérocycle se trouve à différents degrés d'oxydation.

Cette hypothèse découle d'un certain nombre de travaux, dont le point de départ a été la découverte de Szent-Gyorgii en 1936 : le scorbut expérimental est une avitaminose C et P, et dont il ressort :

— Le facteur P est dans l'organisme animal un facteur d'économie et d'utilisation de la vitamine C (7).

L'apport simultané de vitamines C et P permet de réaliser une charge d'acide ascorbique dans les organes 4 à 8 fois plus grande que l'apport de vitamine C seule (7).

— Les corps à activité vitaminique P, en particulier la catéchine droite, semblent capables de protéger l'acide ascorbique de l'oxydation par l'oxygène (8) et de l'oxydation photochimique par le bleu de méthylène (9).

— La *d*-catéchine et la *l*-gallocatéchine se trouvent dans toutes les parties solides du raisin (pellicule, rafle, pépin) (10), l'œnidine se trouve dans les pellicules des raisins rouges. L'activité vitaminique P des trois corps est très différente : la *l*-gallocatéchine est très supérieure à la *d*-catéchine, l'œnidine ne possède que faiblement cette activité (10).

On pourrait alors penser, que les pellicules du Valdiguié contiennent à côté des substances colorantes, des corps apparentés aux tanins catéchiques dans une proportion plus grande que les pellicules du cépage blanc.

Dans l'état actuel des recherches, on connaît toutes les difficultés de séparation et de dosage de ces corps. Il faut arriver à déterminer qualitativement et quantitativement, les dérivés polyphénoliques présents dans la pellicule des raisins blancs et colorés, et établir pour chacun d'eux, leur rôle protecteur vis-à-vis de l'acide ascorbique.

4° Dans la rafle.

L'acide ascorbique contenu dans la rafle, calculé pour 100 grains et pour 100 g de matière fraîche, diminue régulièrement tout au long de la conservation. Cette diminution s'élève à 75 p. 100 dans le fruit coloré et à 82 p. 100 dans le fruit blanc.

Il est à noter que les rafles se sont notablement séchées au cours du stockage, une migration d'eau de la rafle vers le grain doit se produire.

Nous avons aussi considéré les variations subies par les sucres et les acides.

— Les acides et les sucres, que renferment 100 grains, restent sensiblement fixes pendant la plus grande partie de la période de conservation.

On assiste, par la suite, à une légère disparition, celle des acides se produisant avant celle des sucres.

Cette double perte semble être la conséquence d'une attaque de moisissures, plutôt que d'une combustion interne : les moisissures conservent leur activité aux basses températures et les acides sont plus sensibles à leur action que les sucres.

En définitive, 100 grains de raisin voient leur sucre diminuer de 20 p. 100 et leurs acides de 30 p. 100.

Dans le litre de jus, où deux phénomènes se superposent : concentration et destruction, les sucres augmentent continuellement, les acides augmentent d'abord puis diminuent légèrement.

Ceci donnera lieu à une étude ultérieure sur la nature des acides attaqués et sur l'ordre dans lequel ils disparaissent.

Conclusion

Dans les conditions de stockage des raisins, que nous avons réalisées : fruits étalés, température comprise entre 0 et + 3°C :

— La conservation se prolonge 5 mois.

— La disparition de la vitamine C se manifeste d'une manière importante dans les constituants non colorés des fruits. Elle aboutit à 80 p. 100 de perte.

— Dans les parties colorées, la vitamine n'est pas détruite. Cela semble indiquer la présence d'inhibiteurs naturels de destruction de la vitamine C.

— La diminution des acides et des sucres ne se manifeste que vers les 3/4 du temps de stockage et est de faible amplitude.

Ces indications doivent être suivies d'une étude systématique sur le comportement des différents cépages vis-à-vis de l'acide ascorbique. Cette étude pourrait guider dans une certaine mesure les utilisateurs du froid, dans le choix du cépage susceptible d'être soumis au stockage.

Reçu pour publication le 17 *avril* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Pastoriza (R.) et Cordoba (O. G.). — Vitamine C dans les pommes « Red Delicious » et « Delicious ». Pertes pendant l'entreposage frigorifique. *R. Argentina Frio*, **20**, nº 160, 38-48, 1957.
(2) Ulrich (R.). — La conservation par le froid des denrées d'origine végétale. Librairie J. B. Baillières et Fils, 219, 1954.
(3) et (4). D'après Ulrich (R.). — La protection de la qualité des fruits et légumes frais par l'emploi du froid. *Ann. de la Nut.*, **9**, 249, 1955.
(5) « Methods of Vitamin assay » by the association of vitamin chemists Inc. Interscience publishers, Ltd, London, 1947.
(6) Ournac (Mlle A.). — Recherches sur la variation en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. A. T. A. de l'I. N. R. A., **2**, 99, 1953.
(7) Parrot (J.), Gabe (M.) et Cottereau (N.). — *C. R. Soc. Biol.*, **140**, 750, 1946.
(7) Cottereau (N.), Gabe (M.), Gero (E.) et Parrot (J.). — *Nature*, **161**, 557, 1948.
(7) Gabe (M.) et Parrot (J.). — Apport de l'histophysiologie à l'étude de la vitamine C2. *La presse médicale*, **59**, 1740, 1951.
(7) Dourmichidze et Boukine. — *C. R. Ac. Sci. U. R. S. S. Biochimie*, **76**, 703, 1951.
(7) Koursanoff, Boukine, Pavloskaia et Zaprometoff. — *C. R. Ac. Sci. U. R. S. S., Biochimie*, **15**, 337, 1950.
(7) D'après Lavollay (J.). — Les tannoïdes et la question de la vitamine P. *Ann. de la Nut.*, **9**, 323, 1955.
(8) Garcia Valdecasas et Puig Muset. — Accion antioxigeno de la Vitamina « P ». *Trab. Inst. Nac. Sci. Med.*, **2**, 725, 1944.
(8) Parrot (J.) et Cottereau (N.). — La vitamine P et l'oxydation de la vitamine C. *C. R. Soc. Biol.*, **140**, 61, 1946.
(9) Gero (E.). — Le dosage de l'acide ascorbique par le bleu de méthylène en présence de vitamine P. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **29**, 998, 1947.
(10) Lavollay (J.), Parrot (J. L.) et Dussy. — Sur la présence de catéchines dans un certain nombre d'espèces végétales alimentaires. *C. R. Ac. Sc.*, **218**, 82-84, 1944.
(10) D'après Deibner (L.). — Activité physiologique du vin et du raisin et le rôle de leurs composants polyphénoliques d'après les récents travaux. A. T. A. de l'I. N. R. A., **3**, 69, 1954.
(10) Dourmischidze. — d-Catéchine dans le tanin du raisin. *Doklady A. K. Naouk* (*C. R. AcSc.*) *S. S. R.*, **73**, nº 5, 987, 1950.
(10) Dourmischidze. — l-gallo-catéchine dans les substances tanniques du raisin. *Doklady Akad Naouk S. S. S. R.*, **77**, nº 5, 852, 1951.
(10) Dourmischidze et Boukine. — Propriétés physiologiques des substances tanniques et colorantes du raisin. *Doklady Akad Naouk, S. S. S. R.*, **76**, 703, 1951.

INFLUENCE DE L'AUTOLYSE DES LEVURES SUR LA COMPOSITION PHOSPHORÉE ET AZOTÉE DES VINS

PAR

A. BOURDET et J. HÉRARD

Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

Travaux antérieurs.

Constituants phosphorés.
Constituants azotés.
Influence de l'autolyse des levures.

Travaux personnels.

I. — Méthodes d'analyse.

A) Fractionnement des vins :
1° Par les métaux lourds.
2° Sur résine échangeuse de cations.
B) Séparation chromatographique des constituants phosphorés et azotés.
C) Déterminations quantitatives.

II. — Résultats obtenus et discussion.

1. Constituants phosphorés.
2. Constituants azotés.
3. Acides aminés et amides.

III. — Conclusions.

IV. — Bibliographie.

TRAVAUX ANTÉRIEURS

Nous possédons actuellement un ensemble appréciable de données sur la composition phosphorée et azotée des vins. Aussi, avant d'aborder le sujet qui fait l'objet de ce travail, nous pensons qu'il est utile de faire le point de nos connaissances dans ce domaine.

Constituants phosphorés.

Le phosphore se trouve dans les vins à l'état minéral et organique. Les formes minérales, quantitativement les plus importantes, sont constituées d'orthophosphates et de nombreuses méthodes, passées récemment en revue par DEIBNER (9), ont été proposées pour déterminer l'ion orthophosphorique total et minéral dans les vins. RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD ont signalé par ailleurs (31) que les vins nouveaux peuvent contenir également des pyrophosphates.

Les formes phosphorées organiques, de concentration beaucoup plus faible, sont le plus souvent estimées par différence entre le phosphore total et le phosphore minéral. Les seules données que nous possédions sur leur nature nous ont été fournies par des travaux déjà anciens, parmi lesquels prédomine l'importante et intéressante étude que VENTRE publia en 1910 (38).

Les résultats obtenus par cet auteur sur divers cépages (Aramon, Alicante, Carignan, etc.) indiquent que le phosphore organique représente, selon les années, entre 10 et 17 p. 100 du phosphore total.

CARLES (6) a trouvé que les vins de Bordeaux pouvaient contenir de 1,5 à 40 mg de phosphore organique par litre.

L'analyse des constituants du grain de raisin, effectuée parallèlement à celle des vins, a révélé que les pépins sont particulièrement riches en lécithine. VENTRE a pu démontrer que le phosphore organique des vins a pour origine principale la lécithine des pépins. Les vins riches en composés phosphorés organiques sont toujours ceux obtenus à partir de moûts ayant macéré au contact des râfles des peaux et des pépins pendant un temps plus ou moins long (rouge, cuvage). La vinification en blanc donne toujours des produits moins riches en phosphore organique. Pour les mêmes raisons, VENTRE a pu constater que les vins sont d'autant plus riches en combinaisons phosphorées organiques qu'ils proviennent de cépages à petits grains dans lesquels il y a une proportion relative plus grande de peaux, râfles et pépins.

VENTRE n'a pas trouvé de lécithine dans les vins, mais a pu caractériser un de ses produits de scission : l'acide glycérophosphorique. Il a pu également mettre en évidence la présence d'acide diéthylphosphorique résultant d'une lente éthérification entre l'alcool, le glycérol (produit secondaire de la fermentation) et l'acide phosphorique à l'état de phosphates acides. Cette réaction, qui s'effectue progressivement entre les constituants du vin, explique l'accroissement en phosphore organique observé au cours du vieillissement, particulièrement pour les vins rouges, accroissement de l'ordre de 16 à 20 p. 100 selon les cépages.

Il ne semble pas que les acides glycérophosphorique et diéthylphosphorique soient les seuls éléments phosphorés organiques des vins. En 1906

Marco Soave (18) a suggéré que les vins pouvaient contenir un composé inositophosphorique ; or la présence de l'inositol dans les vins a été signalée à maintes reprises et diverses méthodes ont été proposées pour sa détermination quantitative (11-12-28).

Aucun travail n'a fait mention de la présence de son ester hexaphosphorique, mais il est possible que l'acide phytique constitue une autre des formes phosphorées organiques des vins. On sait, d'autre part, qu'une fraction de la vitamine B_1 des vins existe à l'état d'ester phosphorique. La cocarboxylase intervient donc, pour une très faible part il est vrai, dans le matériel phosphoorganique des vins.

Enfin, aucun travail n'en ayant fait état, on ignore si les vins contiennent des composés tels que nucléosides phosphates, pentoses ou hexoses-phosphates.

Constituants azotés.

Les travaux concernant la composition azotée des vins sont à la fois plus nombreux et plus récents. Une revue détaillée en a été faite récemment par Amerine (2), de laquelle nous extraierons les faits essentiels.

On possède de très nombreux résultats analytiques relatifs à la teneur des vins en *azote total* déterminée le plus souvent par la méthode classique de Kjeldahl. Garcia et Freyre (13) ont proposé récemment une méthode colorimétrique permettant d'obtenir en moins de 10 minutes la teneur d'un vin en azote total.

La teneur des vins en azote est extrêmement variable, car elle est fonction entre autres, des facteurs du milieu (climat, nature du sol), du cépage et du mode de vinification.

Les résultats analytiques publiés indiquent, selon qu'il s'agisse de vins rouges, blancs, vins de dessert, vins mousseux, etc. des taux compris entre 46 et 980 mg d'azote par litre.

Barbera (4), puis Muth et Malsch (20) ont été les premiers à fractionner les constituants azotés du vin et à déterminer quantitativement l'azote ammoniacal, aminé, amidé, protéique et la fraction précipitable par l'acide phosphotungstique. Une revue des méthodes utilisées dans ce but a été faite par différents auteurs (26-30-33).

Pour déterminer *l'azote aminé*, Muth et Malsch (20) utilisaient la méthode de Willstaeter, mais la plupart des auteurs ont utilisé soit la méthode de Van Slyke, soit celle de Soerensen dite de formoltitration. Les teneurs des vins en azote aminé reflètent les très fortes variations observées pour l'azote total et oscillent entre 10 et 245 mg par litre. En général, les vins rouges sont plus riches en azote aminé que les vins blancs.

La *fraction amidée* des vins est peu importante et les résultats publiés indiquent des teneurs comprises entre 1 et 8 mg par litre.

L'*azote ammoniacal* n'est présent dans certains vins qu'à l'état de traces, mais on a signalé des cas où le vin pouvait en contenir jusqu'à 200 mg par litre (37).

Quant à l'*azote protéique*, il peut être relativement important dans certains vins tel que le Porto (1), mais dans la plupart des cas, les concentrations les plus élevées ne dépassent pas 25 mg par litre. PEYNAUD (27) a signalé l'existence d'une fraction *polypeptidique* représentant entre 8 et 32 mg d'azote selon les échantillons.

L'*azote* précipitable par l'acide *phosphotungstique* est constitué en principe des formes protéiques et polypeptidiques ; mais il convient d'y ajouter certains acides aminés tels que l'arginine, l'histidine et la lysine, peut-être aussi la cystine qui sont également précipités plus ou moins complètement par le réactif selon les conditions expérimentales. Aussi la détermination quantitative de cette fraction ne présente-t-elle que peu d'intérêt. MUTH et MALSH (20) ont publié des teneurs comprises entre 121 et 314 mg d'azote au litre qui paraissent considérables. Les résultats obtenus par HENNIG (15) indiquent seulement des concentrations de 8 à 25 mg par litre.

Ce même auteur a estimé entre 5 et 18 mg par litre la teneur des vins en *azote humique*.

Des diverses fractions qui composent le matériel azoté des vins, il apparaît donc que les formes aminées sont quantitativement les plus importantes. On est cependant frappé lorsque l'on fait la somme des diverses fractions (N aminé + N amidé + N ammoniacal + N polypeptidique + N protéique) pour établir un bilan en azote, de constater que cette somme ne représente environ que 50 à 60 p. 100 seulement de l'azote total. Il faut donc en conclure que plus du tiers des constituants azotés du vin sont de nature inconnue.

Cette constatation apparaît à priori assez anormale, car on pouvait penser, par le fait qu'il constitue un milieu biologique liquide, que le vin présentait une composition azotée relativement simple.

La présence éventuelle dans le vin de substances azotées de nature inconnue a été signalée par OPARIN et coll. (23-24-25) qui constatent avant la fermentation en bouteilles de vins mousseux, que la moitié environ de l'azote n'est pas déterminable par la méthode de VAN SLYKE. Les mêmes auteurs ont ultérieurement (22) isolé de vins mousseux un composé azoté, de poids moléculaire élevé, non hydrolysable par les enzymes protéolytiques et donnant la réaction des sucres réducteurs. Ils supposent qu'au cours du vieillissement il s'est formé une réaction sucres-protéines donnant naissance à un tel composé.

Quoi qu'il en soit, il n'y a que peu d'années que l'on s'est préoccupé d'étudier la composition des vins en acides aminés.

En 1935, MESTRE et MESTRE (19) avaient identifié la leucine et l'argi-

nine et une méthode colorimétrique de dosage du tryptophane avait été proposée par RIBEREAU-GAYON et PEYNAUD (31). Mais la première tentative de séparation et d'identification des divers acides aminés présents dans les vins a été faite en 1949 par SISAKIAN et BEZINGER (34, 35) à l'aide de la chromatographie sur papier. La détermination semi-quantitative des acides aminés ainsi séparés a d'ailleurs conduit à des résultats en azote aminé plus élevés que ceux obtenus par la technique de VAN SLYKE.

Également, par chromatographie sur papier, VALAIZE et DUPONT (37) et LUTHI et VETSCH (17) ont séparé un certain nombre d'acides aminés présents dans les moûts ou les vins.

Il faut encore citer un travail récent de ALMEIDA (1 *bis*) concernant la caractérisation des acides aminés du vin de Porto par chromatographie d'échange d'ions.

Des précisions quantitatives sur la concentration respective des acides aminés présents dans les vins et les moûts ont été fournies par CASTOR et GUYMON (8) et CASTOR (7) à l'aide de méthodes microbiologiques. AMERINE (2) a fait état de la plupart de ces travaux dans son importante revue.

Dans la mesure où ils peuvent être comparés et interprétés quantitativement, ces résultats indiquent des concentrations élevées en acide glutamique, alanine et proline, et en ce qui concerne la plupart des autres acides aminés identifiés, des concentrations beaucoup plus faibles, souvent inférieures à 20 mg par litre [1].

Influence de l'autolyse des levures.

L'étude que nous avons entreprise avait pour but de déterminer en quelle mesure la composition phosphorée et azotée des vins est susceptible d'être modifiée lorsque les conditions de la vinification font intervenir un contact prolongé du vin et des lies. En d'autres termes, que deviennent en qualité et en quantité les substances phosphorées et azotées du vin, lorsque l'on provoque dans le milieu l'accumulation des produits de dégradation cellulaire que les levures libèrent en s'autolysant ?

Un certain nombre de travaux ont fait état de cette influence des levures sur la composition des vins.

Dans une étude comparée sur la composition des vins de lies et de soutirage, SEMICHON signalait en 1922 (32 *bis*) que la digestion pendant plusieurs semaines des levures entraînées dans le vin au moment du décuvage se traduisait par un accroissement de plus du double de la teneur du vin en phosphore total.

[1] Ayant eu connaissance du récent travail de CARLES et coll. sur les acides aminés libres du vin (*C. R. Acad. Sci.*, **246**, 1254, 1958) alors que la rédaction de notre mémoire était achevée, il ne nous a pas été possible d'en faire état parallèlement aux autres travaux cités.

En 1938, NIEHAUS (21) observait que le contact d'un vin nouveau avec les lies augmente sa teneur en azote, et plus récemment SCHANDERL (32) a pu constater au cours du vieillissement des vins mousseux en bouteilles, qu'après un délai de 9 à 13 mois, un tiers de l'azote libéré de la levure par autolyse se retrouve dans le vin.

Les modifications des substances azotées dans les vins mousseux au cours de la fermentation en bouteilles et de leur séjour au contact des levures ont également fait l'objet des intéressants travaux d'OPARIN et coll. (23-24-25). Ils notent que pratiquement toutes les cellules de levure meurent 80 à 90 jours environ après le départ de la fermentation. Les cellules mortes libèrent des protéases dans le milieu et des modifications sont apportées aux substances azotées. Fait curieux, la teneur du vin en azote total diminue après 110 jours et jusqu'à 255 jours ; elle revient à sa valeur initiale après 370 jours. Tout se passe comme s'il se formait dans ces conditions des composés azotés de structure inconnue échappant au dosage selon KJELDAHL.

A mesure que se poursuit la fermentation, on assiste à un accroissement de l'azote aminé ; après un délai voisin d'un an, les protéases de la levure sont devenues inactives et on n'observe plus aucune modification ultérieure de l'azote aminé. Enfin, CASTOR (6 *bis*) a observé une diminution rapide des acides aminés pendant les premiers stades de la fermentation du moût suivie d'un accroissement de certains d'entre eux dans les derniers stades, phénomène qu'il attribue à une autolyse des cellules de levure.

TRAVAUX PERSONNELS

L'étude qui va être décrite a porté sur deux vins rouges et trois vins blancs.

Pour les vins rouges, l'échantillon témoin (n° 2) présentant les caractères d'un vin ordinaire type « Corbières » (degré alcoolique 12°, acidité totale 5 g/litre) a été comparé à un vin de même nature, mais entrant dans la catégorie des vins de lie (n° 1).

Voici comment ont été obtenus les échantillons 2 et 1. 25 kg de raisin de Carignan, foulés à la main, ont été abandonnés à la fermentation alcoolique, sans addition préalable de SO_2. Quatre jours après, la totalité du liquide a été extraite et mise en bonbonnes, où la fermentation s'est poursuivie pendant 8 jours. On a alors décanté la partie liquide (18 litres) et laissé en bonbonne le dépôt appelé lies. Le liquide a fourni le vin n° 2.

Deux litres de ce même liquide ont été mis au contact avec la totalité des lies, l'ensemble étant agité une fois par jour pendant 7 jours. Au huitième jour, on a séparé le liquide de ses lies. Le vin obtenu a constitué l'échantillon n° 1.

Pour les vins blancs nous avons étudié parallèlement d'une part, un

vin commercial de consommation courante (échant. n° 5) d'autre part, deux vins de Château Châlon (éch. n°s 3 et 4), mieux connus sous le nom de vins jaunes, et dont la préparation met en jeu un séjour sur les lies de plusieurs années [1].

I. — MÉTHODES D'ANALYSE

Certains essais concernant les vins rouges ont nécessité leur décoloration préalable par le charbon animal. A titre de comparaison le même traitement a été appliqué aux vins blancs.

A. — Fractionnement des vins.

1. — Par les métaux lourds.

Une autre technique classique de décoloration des vins par les sels de métaux lourds s'est révélée utile dans cette étude.

En traitant les vins préalablement neutralisés au CO_3NaH par le nitrate d'argent 1 M (pH 8,4) et l'acétate de plomb 20 p. 100 (pH 6,5) on précipite, avec les matières colorantes et les tanins, les phosphates et les composés puriques et pyrimidiques éventuellement présents.

Après décomposition du précipité par H_2S, les extraits obtenus sont soumis, après concentration, à la chromatographie sur papier pour caractériser les constituants puriques et pyrimidiques.

La fraction non précipitable est d'une part analysée quant à sa teneur en phosphore, d'autre part, désalifiée sur résine échangeuse de cations (Permutite 50). On recueille séparément le filtrat acide et au moment de l'élution par NH_4OH 1 N, l'effluent qui précède le front ammoniacal. Après concentration convenable, les deux extraits obtenus sont chromatographiés séparément en vue de l'identification des phosphates organiques.

2. — Sur résine échangeuse de cations.

On dispose de colonnes de Dowex 50 (X 4, 20-50) de 1 cm de diamètre, 10 cm de hauteur et d'une capacité totale de 10 m. eq. d'N, sur chacune desquelles on fait écouler 50 cm^3 de vin représentant environ 1 m. eq. d'N sous forme aminée. Le filtrat acide recueilli, après rinçage de la colonne par l'eau distillée, donne un test négatif à la ninhydrine.

Les acides aminés retenus sur la colonne sont ensuite déplacés par NH_4OH 1 N et l'effluent recueilli par fractions de 20 cm^3. Il s'écoule de 30 à 35 cm^3 d'effluent à réaction neutre, incolore pour les vins blancs,

[1] Nous remercions MM. Flanzy et Barré d'avoir bien voulu nous fournir les échantillons de vin nécessaires à cette étude.

légèrement coloré en rose pour les vins rouges. L'effluent devient ensuite alcalin et présente une coloration brunâtre, puis jaunâtre donnée par une partie des pigments retenus initialement sur la colonne avec les acides aminés.

Le volume d'effluent qu'il convient de prélever pour recueillir la totalité des acides aminés est déterminé dans une opération préliminaire en testant par la ninhydrine une partie aliquote de chaque fraction de 20 cm^3, après avoir préalablement chassé l'ammoniaque par évaporation.

A partir du moment où l'ammoniaque est versée au sommet de la colonne, il s'écoule de 6 à 8 cm^3 d'effluent neutre ne donnant pas la réaction à la ninhydrine. La réaction devient fortement positive dans les 25 cm^3 d'effluent neutre qui suivent ; il faut recueillir environ 175 cm^3 de l'éluat ammoniacal qui s'écoule ensuite pour que les acides aminés soient élués en totalité. Au-delà de ce volume, la réaction à la ninhydrine est de nouveau négative.

L'ammoniaque est éliminée de l'éluat alcalin par distillation sous pression réduite. L'extrait obtenu après concentration est réuni à la fraction neutre de l'effluent et l'ensemble amené à un volume connu (25 cm^3).

On détermine alors l'azote aminé total ; une partie aliquote du même extrait est concentrée 10 fois, après quoi des prises de 10 à 20 µl sont utilisées pour la séparation chromatographique des acides aminés.

B. — Séparation chromatographique des constituants phosphorés et azotés.

La recherche des *composés phosphorés organiques* est effectuée sur la fraction des vins non précipitable par les métaux lourds, par chromatographie ascendante unidimensionnelle sur papier (Whatman n° 1). Divers solvants classiques de séparation des esters phosphates ont été utilisés à cet effet et plus particulièrement le mélange méthanol (60^v) eau (30^v) NH_4OH (10^v) proposé par Bandurski et Axelrod (3).

Au réactif molybdo-perchlorique de Hanes et Isherwood (14) pour la révélation des produits séparés, nous avons préféré celui proposé par Wade et Morgan (39) ($FeCl_3$ 0,1 p. 100 dans éthanol 75 p. 100, puis acide sulfosalicylique 7 p. 100 dans éthanol 75 p. 100) donnant des taches blanches sur fond mauve pâle et permettant la conservation des chromatogrammes.

La recherche des *composés puriques et pyrimidiques* a été faite par chromatographie bidimensionnelle sur papier dans les conditions décrites antérieurement (5) à l'aide des systèmes solvants : Butanol 3° 0,3 N en HCl et *n*-Propanol (60^v) NH_4OH(30^v) eau (10^v) pour les nucléotides, *n*-Butanol (86^v) eau (14^v) et alcool isoamylique-PO_4HNa_2 5 p. 100 pour les

nucléosides et les bases. Les produits séparés ont été localisés par photographie en lumière ultra-violette.

La séparation des *acides aminés* a été réalisée également par chromatographie bidimensionnelle sur papier (Whatman n° 1 feuilles de 28,5 × 46 cm) à l'aide de deux systèmes solvants. Utilisés parallèlement, ils permettent d'effectuer la séparation complète des acides aminés en mélange complexe sous forme de taches bien délimitées. Monophasiques, ils ne sont pas affectés par des variations de température ; en outre, grâce au déplacement rapide des acides aminés et à la valeur élevée de Rf de certains d'entre eux, ils évitent les écoulements prolongés, avantages non négligeables pour les analyses en série. C'est à la suite d'une étude systématique des nombreux solvants décrits dans la littérature que notre choix s'est arrêté sur ceux dont nous donnons la description.

Système A.

1re *dimension* : solvant proposé par Hogstrom (16) ; méthyléthylcétone (60v) acétone (20v) eau (20v) acide formique (2v) écoulement descendant 15 à 17 heures à température ordinaire ; distance parcourue par le solvant : 42 cm.

2e *dimension* : solvant dû à Redfield (29) ; méthanol (80v) eau (20v) pyridine (4v) ; écoulement ascendant 10 heures à température ordinaire pour une distance de 28,5 cm.

Après chaque écoulement, le séchage s'effectue rapidement à l'air.

Un tel système sépare mal les 3 acides diaminés, l'asparagine, l'alanine et la proline ; la séparation de glycine, sérine et acide glutamique peut être médiocre si les concentrations sont élevées. Les taches données par la leucine et l'isoleucine se touchent, mais peuvent être séparées.

Système B.

1re *dimension* : solvant de Redfield utilisé dans les mêmes conditions que dans le système A.

2e *dimension* : solvant utilisé par Filteau et Martel (10) : Phénol (80v), eau (20v), écoulement descendant : 48 heures à température ordinaire pour 42 cm. Le phénol est éliminé par séchage des chromatogrammes une nuit à 45-50°C. On peut éventuellement éliminer les dernières traces de phénol par lavage des feuilles à l'éther, mais l'opération n'est pas indispensable.

Ce système permet une bonne séparation des diacides, des diaminés, des amides, de la glycine, de la sérine et de la proline mal ou insuffisamment séparés dans le système A. A l'opposé, méthionine, valine, phénylalanine, leucine et isoleucine, convenablement séparés dans le système A, le sont parfois insuffisamment dans le système B si les concentrations sont trop élevées.

La révélation des taches s'effectue en pulvérisant sur les chromatogrammes séchés une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 dans l'éthanol

pour les essais qualitatifs, à 1 p. 100 pour les essais quantitatifs. Dans le premier cas, on laisse les colorations se développer progressivement à température ordinaire ; pour les déterminations quantitatives, les chromatogrammes sont exposés pendant 30 minutes à 50°C dans une enceinte saturée en éthanol et CO_2 selon la technique décrite par THOMPSON et coll. (36).

Dans les deux systèmes, la proline donne une tache jaune, l'asparagine une tache orangé. Tous les autres acides aminés donnent une coloration violette tirant, selon les cas, soit sur le bleu gris, soit sur le pourpre.

L'emploi simultané des 2 systèmes solvants décrits permet une identification plus sûre des acides aminés séparés et une interprétation plus rigoureuse des chromatogrammes.

C. — Déterminations quantitatives.

1. — Constituants phosphorés.

La microméthode colorimétrique de MACHEBOEUF-DELSAL a été utilisée pour doser le Phosphore total des vins, après minéralisation sulfonitrique, le Phosphore labile (hydrolysable en 7 minutes à 100°C en milieu acide 1 N) et l'orthophosphate. Le Phosphore organique a été estimé par la différence P total — (P ortho + P labile).

La détermination des formes P labile et P ortho a nécessité une décoloration préalable des vins rouges ; sur les vins blancs, les mêmes dosages ont été faits parallèlement avant et après traitement au charbon animal.

Par suite de leur très faible concentration, les constituants organiques séparés par chromatographie n'ont pas été dosés.

2. — Constituants azotés.

La teneur des vins en *azote total* a été déterminée par la méthode classique de KJELDAHL.

L'*azote aminé* total a été dosé par formoltitration au potentio-pH-mètre, d'une part sur les vins préalablement déféqués au baryum et éventuellement décolorés (vins rouges), d'autre part sur la solution aminée obtenue après fractionnement des vins sur Dowex 50. La très faible concentration des milieux en azote aminé a nécessité le titrage par NaOH N/50.

Les déterminations de l'*azote ammoniacal* et de l'*azote amidé* (après hydrolyse) ont été faites à l'appareil de YOVANOVITCH (éch. nos 4 et 5).

L'*azote* précipitable par l'acide *phosphotungstique* (éch. nos 2 et 3) a été dosé sur le précipité obtenu en traitant 10 cm³ de vin par 0,5 cm³ de SO_4H_2 concentré et 10 cm³ de réactif phosphotungstique (100 g ac.

phosphotungstique + 70 g SO_4H_2 dans 1 000 cm^3). Après repos 24 heures au froid on centrifuge et lave l'insoluble par le réactif dilué.

Les *acides aminés* et les *amides* séparés par chromatographie, sont dosés par l'intermédiaire de la coloration obtenue avec la ninhydrine. Les taches sont découpées, éluées par l'éthanol 50 p. 100 et les densités optiques mesurées au spectrophotomètre à 570 mμ. Les concentrations respectives sont alors calculées en se reportant aux courbes d'étalonnage établies pour chaque acide aminé, compte tenu de l'influence exercée par chaque système solvant sur l'intensité des colorations.

Dans le cas particulier de la proline et de l'asparagine, les densités optiques ont été mesurées à 350 mμ longueur d'onde où, dans nos conditions expérimentales, l'absorption du complexe donné avec la ninhydrine est maxima. Les mesures doivent être faites assez rapidement car l'absorption à cette longueur d'onde disparaît après plusieurs heures.

Pour un expérimentateur exercé, le dosage des acides aminés séparés par chromatographie peut être effectué avec une erreur moyenne de ± 5 p. 100. Selon la nature de l'acide aminé et les concentrations à doser, cette erreur peut être soit plus élevée soit plus faible.

II. — RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

Nous avons rapporté dans le tableau I suivant la composition des vins étudiés en azote et en phosphore. Les résultats sont exprimés d'une part en mg de P ou d'N par litre, d'autre part en p. 100 de l'azote ou du phosphore.

Ils permettent de constater en premier lieu que le traitement des vins au charbon animal s'accompagne de pertes par adsorption plus ou moins importantes. Ces pertes sont relativement minimes en ce qui concerne le phosphore : nulles pour les vins nos 2 et 5, elles ne dépassent pas 3 p. 100 du phosphore total pour les échantillons 1 et 4. Elles sont, en revanche, beaucoup plus sensibles dans le cas de l'azote : respectivement égales à 9 et 14 p. 100 pour les vins blancs 4 et 5, elles s'élèvent jusqu'à 20 p. 100 pour les vins rouges. Il est vraisemblable, dans le cas des vins rouges, que l'adsorption des matières colorantes par le charbon animal favorise également celle de certaines substances azotées, cette adsorption étant plus limitée pour les vins blancs moins chargés en substances colorantes.

Quoi qu'il en soit, les teneurs en phosphore et en azote des vins ayant subi un contact prolongé avec les lies, et plus particulièrement les échantillons nos 1 et 3 sont manifestement plus élevées que celles des vins témoins (éch. nos 2 et 5). Ces faits confirment donc en tous points les observations faites antérieurement par Sémichon (32 *bis*) et Niehaus (21). Le vin rouge ayant séjourné sur lies contient 1,8 fois plus de phosphore

Tableau I

Composition phosphorée et azotée des vins

	Rouges		Blancs			Rouges		Blancs		
	« Levuré »	Témoin	Château-Châlon		Témoin	« Levuré »	Témoin	Château-Châlon		Témoin
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Phosphore	mg P/litre					p. 100 du P total				
P total										
direct	167	92,7	146,4	165	117,9	—	—	—	—	
après décoloration	162	92,7	—	159	117,9	97	100	—	96,4	100
P ortho										
direct	—	—	131,4	145,2	107,1	—	—	89,7	88	90,8
après décoloration	156	81,9	—	137,5	108,9	93,4	88,3	—	83,3	92,3
P labile										
direct	—	—	1,2	1,2	2,7	—	—	0,8	0,7	2,3
après décoloration	2,4	0,9	—	2,9	1,8	1,5	1	—	1,8	1,6
P organique										
direct	—	—	13,8	18,6	8,1	—	—	9,4	11,3	6,9
après décoloration	3,6	9,9	—	18,6	7,2	2,1	10,7	—	11,3	6,1
Azote	mg N/litre					p. 100 de N total				
N total										
direct	540	216,4	428,4	270	234,6	—	—	—	—	—
après décoloration	429	176,1	—	245	201,6	79,5	81,4	—	90,8	86
N aminé										
défécation Ba	170	52	105	109	63	31,5	24	24,5	40	26,7
Dowex 50	176	105	140	—	73	32,6	48,5	32,6	—	32
N des ac. aminés (chromatographie)	309,5	195,1	404,6	—	213,3	57,3	90,1	94,4	—	90,9
N des amides (chromatographie)	41	20,7	13,9	—	13,9	7,6	9,5	3,7	—	5,8
N « résiduel »	189,5	0,6	9,9	—	7,4	35,1	0,4	1,9	—	3,3

et 2,5 fois plus d'azote que le témoin ; les différences sont moindres pour les vins blancs, mais demeurent significatives : le Château Châlon n° 3, par exemple, contient 1,2 fois plus de phosphore et 1,8 fois plus d'azote qu'un vin blanc de consommation courante ; pour l'échantillon n° 4, les rapports passent à 1,4 pour le Phosphore et à 1,15 seulement pour l'azote.

Il convient d'ailleurs de noter que la préparation d'un vin rouge tel que l'éch. n° 2 a été réalisée à titre expérimental et n'a pas son équivalent dans les techniques usuelles de vinification en rouge. Dans ce cas particulier, les phénomènes ont été volontairement exagérés.

Sur le plan de la pratique œnologique, la comparaison des deux vins du Jura et du vin blanc ordinaire demeure, au contraire, tout à fait valable et démontre clairement l'influence exercée par le phénomène d'autolyse des levures sur la composition azotée et phosphorée des vins.

Des renseignements complémentaires nous sont d'ailleurs fournis par les résultats concernant la nature et l'importance respective des divers constituants des vins examinés.

Constituants phosphorés.

L'examen du tableau I fait apparaître, indépendamment des conditions de préparation des vins, qu'une très forte proportion du phosphore se trouve sous forme minérale à l'état d'*orthophosphate*, puisque, selon les échantillons, celui-ci représente entre 88 et 93 p. 100 du phosphore total.

Pour chaque vin, l'analyse met en évidence l'existence d'une fraction phosphorée, libérant de l'orthophosphate par hydrolyse légère. Cette fraction *P labile*, qui ne représente que de 1 à 1,8 p. 100 du P total, peut être constituée de méta ou pyrophosphates minéraux. Dans les mêmes conditions, les nucléosides 5' di et triphosphates, que l'hydrolyse scinde en leurs dérivés monophosphates correspondants, ainsi que les hexoses 1' phosphates libèrent de l'orthophosphate.

La fraction phosphorée ne libérant pas d'orthophosphate après hydrolyse ménagée, a été dénommée *P organique*. Divers composés phosphoorganiques ne sont en effet pas dégradés dans ces conditions : les nucléosides 3' ou 5' monophosphates, les pentoses 3' ou 5' phosphates, les hexoses 6' phosphates, les acides phosphoglycériques, les glycérophosphates et l'inositol hexaphosphate ou acide phytique.

Estimée par différence, cette fraction P organique constitue selon les vins entre 2,1 et 11,3 p. 100 du phosphore total. Si on considère les teneurs respectives des échantillons, on constate que le vin rouge abandonné au contact des levures (n° 1) est moins riche en phosphore organique que le vin témoin (n° 2). Au contraire les deux Château Châlon contiennent par litre environ 2 fois plus de phosphore organique que le vin blanc témoin (n° 5).

L'autolyse des levures semble donc n'exercer aucune influence sur la composition en phosphore organique des vins rouges. Cette influence apparaît au contraire sensible pour les vins de Château Châlon dont environ 10 p. 100 du phosphore total sont sous forme organique.

Le fractionnement des vins par les sels de métaux lourds semble apporter certains renseignements sur la nature des constituants phospho-organiques des vins.

En même temps que les matières colorantes et les tanins, le traitement aux sels de plomb et d'argent, précipite la totalité de l'orthophosphate et des nucléosides phosphates. Or l'analyse chromatographique des extraits obtenus à partir des complexes insolubles n'a révélé l'existence d'aucun constituant de nature nucléotidique.

Nous avons pu vérifier d'autre part que la fraction des vins non précipitable par les sels de métaux lourds, ne contenait ni d'orthophosphates, ni de formes phosphorées labiles. Elle contient néanmoins encore une certaine quantité de phosphore représentant pour les vins 1, 2, 4 et 5 respectivement 3,7-10-9,7 et 7,2 p. 100 du phosphore total. Or, ces proportions établies par dosage sont sensiblement les mêmes que celles de la fraction P organique déterminées par la différence P total — (P ortho + P labile) et respectivement égales, ainsi que l'indique le tableau I, à 2,1-10,7-11,3 et 6,9 p. 100 du phosphore total.

Il est donc vraisemblable que la fraction phosphorée qui échappe à la précipitation par les sels de plomb et d'argent contient le ou les constituants phosphoorganiques du vin. Ceux-ci ne sont donc pas précipitables par les métaux lourds et ne contiennent pas de groupements phosphates labiles. Les nucléosides phosphates et les inositol-phosphates résistent bien à l'hydrolyse légère, mais ils précipitent par le plomb ou l'argent, et on n'a d'ailleurs identifié aucun nucléotide. Seuls répondent à ces propriétés, les acides phosphoglycériques et les glycérophosphates.

Or l'analyse chromatographique de la fraction non précipitable des vins, préalablement traitée sur Permutite, a révélé la présence dans l'effluent précédant le front ammoniacal, d'un constituant phosphoré de comportement analogue à celui de l'acide glycérophosphorique. De même Rf que ce dernier utilisé comme marqueur (0,68) dans le solvant de Bandurski et Axelrod, il donne la coloration caractéristique des esters phosphoriques ; le filtrat acide ne le contient pas et ses propriétés d'acide faible expliquent qu'il soit retenu sur la résine et déplacé à mesure que progresse le front ammoniacal.

Bien que d'autres arguments d'ordre expérimental ne puissent être apportés, il semble que le composé isolé soit bien de l'acide glycérophosphorique, et par des moyens analytiques totalement différents, nous apportons ainsi confirmation aux conclusions de Ventre.

Le composé isolé par chromatographie était présent dans tous les

vins ; n'en ayant pas fait la détermination quantitative, il nous est difficile de dire quelle proportion de phosphore organique se trouve à l'état d'acide glycérophosphorique dans les vins examinés.

Il est évident qu'une telle étude est incomplète. Il est de même probable que la mise en œuvre de techniques modernes d'analyse permettrait d'aboutir assez rapidement à l'identification des divers constituants phosphorés organiques des vins, quantitativement peu importants, mais d'une importance qualitative certaine.

2. — Constituants azotés.

Comme nous l'avons vu, les résultats publiés par les auteurs qui ont déterminé les proportions respectives des diverses formes de l'azote dans les vins font ressortir une prédominance quantitative des formes aminées.

L'azote à l'état ammoniacal, amidé, peptidique et protéique ne constitue qu'une fraction beaucoup plus faible de l'azote total ; nous avons d'ailleurs fait observer à ce sujet que la somme des pourcentages en azote apportés par chaque fraction, fait ressortir un bilan azoté incomplet, montrant selon les cas, que de 40 à 50 p. 100 des constituants azotés ne sont pas dosés et demeurent indéterminés.

Des constatations analogues se dégagent de nos propres résultats. Ceux relatifs à l'azote aminé ont été rapportés dans le tableau I et appellent diverses remarques.

Tout d'abord la défécation des vins par le baryum, jointe à une décoloration par le charbon animal dans le cas des vins rouges, détermine une perte parfois notable en azote aminé. Les valeurs concernant la fraction aminée des vins fractionnés sur Dowex sans avoir subi le moindre traitement préalable, apparaissent en effet systématiquement plus élevées que celles obtenues sur les vins déféqués et éventuellement décolorés. Seules doivent donc être considérées comme significatives, les teneurs en azote aminé obtenues après traitement des vins sur résine échangeuse d'ions.

Or, on constate que l'*azote aminé* déterminé dans ces conditions représente, selon les échantillons, 32 p. 100 au moins (éch. n° 2) et 48,5 p. 100 au plus (éch. n° 5) de l'azote total. En supposant que l'analyse permette d'établir un bilan azoté complet, il faut admettre qu'entre 68 et 51,5 p. 100 de l'azote des vins étudiés se trouve à l'état ammoniacal, amidé, polypeptidique, protéique ou non protéique. Or, les déterminations effectuées ne permettent pas de rendre compte de telles différences.

On a trouvé pour les vins n°s 4 et 5 que l'*azote ammoniacal* constitue respectivement 7,1 et 3,3 p. 100 et l'*azote amidé* 7 et 3 p. 100 de leur azote total.

La détermination de l'*azote polypeptidique* par différence entre l'azote

aminé dosable avant et après hydrolyse des vins (4 heures à 100°C en milieu chlorhydrique 1 N) s'est révélée délicate et les résultats obtenus n'ont jamais été significatifs.

Quant à la fraction azotée précipitable par l'acide *phosphotungstique*, il est assez difficile d'en préciser la nature, puisque, nous l'avons vu, le réactif précipite avec les protéines et les polypeptides, les acides diaminés et une partie de la cystine. Nous avons trouvé pour les vins nos 2 et 3 que respectivement 64,4 et 82,6 mg d'azote, soit 29,7 et 19,2 p. 100 de l'azote total étaient précipités dans ces conditions.

L'analyse chromatographique de la fraction précipitable par les sels de métaux lourds a permis, d'autre part, de constater que les vins contenaient des traces d'*azote non protéique* à l'état de bases puriques et pyrimidiques. Nous avons pu, en effet, identifier de la guanine, de l'hypoxanthine, de la xanthine et de l'uracile dans le vin rouge n° 1, de la xanthine seulement dans les échantillons 2, 4 et 5.

Il est bien évident que la somme des fractions ainsi caractérisées ou dosées ne permet pas d'établir un bilan azoté complet.

Nous allons voir que les résultats concernant la composition quantitative des vins en acides aminés conduisent à une interprétation plus satisfaisante quant à l'importance respective de leurs divers constituants azotés.

3. — Acides aminés et amides.

Nous avons rapporté dans le tableau II, la composition qualitative et quantitative des vins en acides aminés libres et en amides, telle qu'elle a pu être établie par la technique de chromatographie sur papier décrite précédemment. Les figures I et II reproduisent, d'autre part, l'aspect des chromatogrammes obtenus dans les deux systèmes solvants indiqués, avec la position respective des acides aminés et des amides identifiés.

Un premier examen de ces résultats fait apparaître une similarité étroite en ce qui concerne la composition qualitative des vins examinés. Qu'il s'agisse de vins rouges ou de vins blancs, que leur préparation ait fait ou non intervenir un contact prolongé avec les levures, les mêmes acides aminés sont présents : diacides, diaminés (arginine et histidine à l'état de traces dans l'échantillon n° 1), cystine (à l'état de traces dans le n° 3) et méthionine ; tous les monoaminés monoacides aliphatiques sont présents, y compris les acides α et γ aminobutyriques ; parmi les monoaminés cycliques, seul le tryptophane est absent dans les 4 vins examinés. L'absence de tryptophane que révèle l'examen des chromatogrammes a d'ailleurs été confirmée en effectuant, sur la fraction aminée après passage des vins sur Dowex, la réaction au paradiméthyl-aminobenzaldéhyde. Cette réaction a toujours été négative.

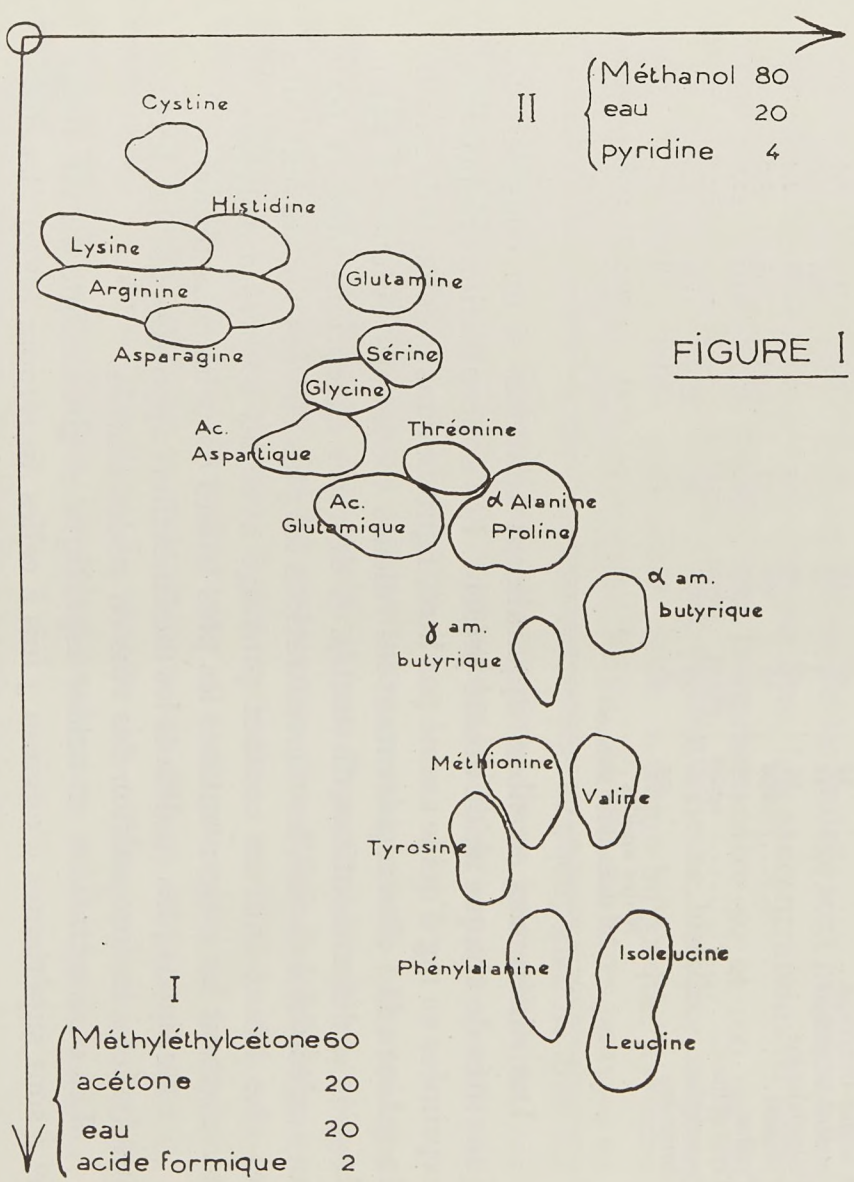


FIGURE I

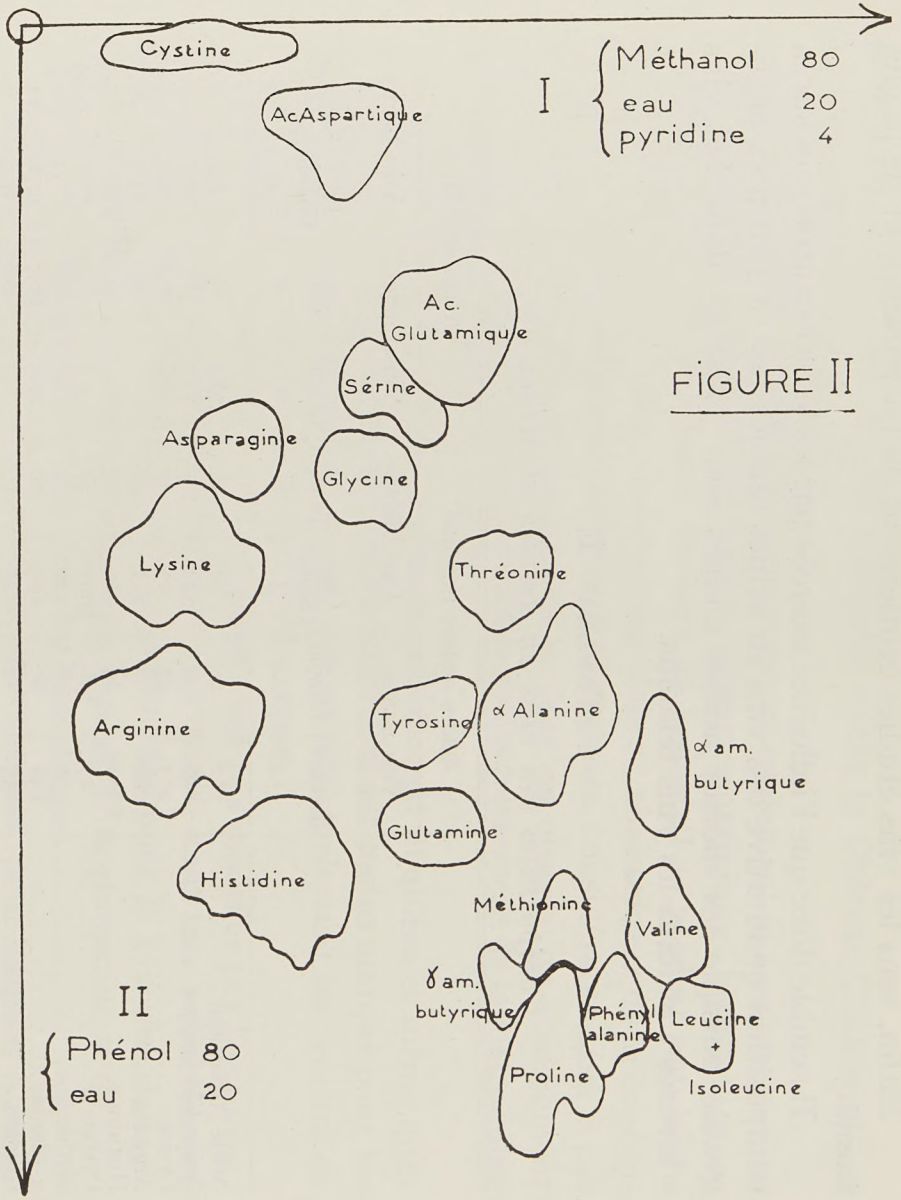


FIGURE II

Figures I et II. — Séparation des acides aminés et des amides libres des vins par chromatographie bidimensionnelle sur papier.

Enfin, tous les vins étudiés contiennent de l'asparagine et de la glutamine.

Il semble donc que l'influence exercée par les levures autolysées sur la composition qualitative des vins en acides aminés soit à peu près négligeable puisque les mêmes acides aminés sont présents dans les vins « levurés » et dans les vins témoins.

TABLEAU II

Composition des vins en amides et acides aminés.

	Acides aminés (mg/litre)				Azote (mg/litre)			
	Vins rouges		Vins blancs		Vins rouges		Vins blancs	
	Levuré 1	Témoin 2	Ch.-Châlon 3	Témoin 5	Levuré 1	Témoin 2	Ch.-Châlon 3	Témoin 5
Acide Aspartique	252	76	81	72	26,5	8	8,5	7,6
Acide Glutamique	828	334	374	315	78,7	31,7	35,5	29,9
Lysine	203	43	17	37	38,8	8,2	3,3	7,1
Arginine	traces	84	211	91	—	26,9	67,5	29,1
Histidine	traces	34	489	13	—	9,2	132	3,5
Cystine	27	106	traces	47	3,1	12,3	—	5,4
Méthionine	30	28	120	49	2,8	2,6	11,3	4,6
α-Alanine	138	67	109	70	21,7	10,5	17,1	11
Glycine	35	12	25	16	6,5	2,2	4,7	3
Sérine	25	9	16	11	3,3	1,2	2,1	1,5
Thréonine	61	27	51	32	7,1	3,2	6	3,7
Valine	83	19	41	16	10	2,3	4,9	1,9
Leucine	82	36	45	17	8,7	3,8	4,8	1,8
Isoleucine	131		33	7	13,9		3,5	0,7
α amino-butyrique	32	28	18	19	4,3	4	2,4	2,6
γ amino-butyrique	11	3	6	5	1,5	0,4	0,8	0,6
Phénylalanine	67	22	28	15	5,6	1,8	2,4	1,3
Tyrosine	250	32	68	37	19,3	2,5	5,2	2,8
Proline	477	531	765	770	57,7	64,3	92,6	93,2
Tryptophane	néant	néant	néant	néant	—	—	—	—
Asparagine	108	56	28	41	22,9	11,9	5,9	8,7
Glutamine	95	46	42	27	18,1	8,8	8	5,2
N des amides					41	20,7	13,8	13,9
N des acides aminés					309,5	195,1	404,6	213,3

Des différences sensibles apparaissent toutefois si on considère les quantités de chaque acide aminé présent. Les concentrations respectives, exprimées en mg d'acide aminé par litre, figurent dans la colonne de gauche du tableau II ; elles représentent les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 ou 4 déterminations distinctes. A de rares exceptions près, et pour un acide aminé donné, les concentrations les plus élevées s'observent dans les vins ayant subi un contact prolongé avec les levures autolysées, et inversement les concentrations les plus basses dans les vins témoins.

Examinons plus en détails les modifications apportées par les levures autolysées à la composition des vins en acides aminés.

Les concentrations en acides aspartique et glutamique du vin rouge n° 1 sont supérieures d'environ 3 fois à celles du témoin (n° 2) ; les diffé-

rences sont beaucoup moins marquées entre le Château-Châlon (n° 3) et le vin blanc témoin (n° 5).

De profondes modifications intéressent également la composition en acides diaminés : avec les vins rouges, pertes en arginine et histidine, mais accroissement très important du taux de lysine. Il se produit un phénomène absolument inverse avec les vins blancs ; abaissement de la concentration en lysine, mais enrichissement en arginine, considérable dans le cas de l'histidine. Avec les acides aminés soufrés, on observe un abaissement de la teneur en cystine, mais par contre un accroissement de la méthionine pour le Château-Châlon (vin n° 3).

Les teneurs en monoacides monoaminés sont doublées et même quadruplées pour les vins rouges ; l'enrichissement est moins marqué pour les vins blancs, mais dans les deux cas, ce sont principalement les teneurs en α-alanine, leucine et isoleucine qui sont accrues.

La teneur élevée des vins en proline n'est pas modifiée par l'autolyse, les concentrations en phénylalanine et en tyrosine sont très sensiblement augmentées, dans des proportions considérables pour la tyrosine dans le vin rouge. Accroissement important également de la glutamine et de l'asparagine, particulièrement net avec les vins rouges.

Si l'on considère d'autre part les vins témoins, pour lesquels n'entre pas en ligne de compte l'influence des levures, leur composition quantitative en acides aminés peut se définir ainsi : très grande richesse en proline (de 530 à 770 mg par litre) teneur élevée en acide glutamique supérieure à 300 mg par litre. Tous les autres acides aminés sont présents à des concentrations inférieures à 100 mg par litre. Les concentrations en acide aspartique, α-alanine et arginine sont comprises entre 50 et 100 mg au litre. Aux concentrations de 20 à 50 mg, on trouve lysine, histidine, méthionine, thréonine, leucine, isoleucine, acide α-amino-butyrique, tyrosine ainsi que l'asparagine et la glutamine. Enfin, les vins sont très pauvres en glycine, sérine, valine, acide γ amino-butyrique et phénylalanine dont les concentrations sont inférieures à 20 mg/litre. Dans leur ensemble, ces chiffres semblent être d'un ordre de grandeur voisin de ceux rapportés par Castor et Guymon (8) et Castor (7).

Quant aux différences de composition pouvant exister entre les vins témoins rouges et blancs, elles semblent peu importantes : le vin rouge n° 2 se caractériserait par des teneurs un peu plus élevées en histidine et phénylalanine, notablement plus fortes en cystine ; le vin blanc lui-même contiendrait un peu plus de méthionine et nettement plus de proline.

Nous avons rapporté dans la colonne de droite du tableau II, les équivalents en azote (mg/litre) de chacun des acides aminés identifiés et dosés dans les vins étudiés. Un calcul analogue a été fait pour les deux amides.

Ces équivalents ont été calculés à partir de la teneur en azote total de

chaque acide aminé. Dans le cas des acides mono- et dicarboxyliques, où le seul atome d'azote de la molécule est celui de la fonction aminée, l'azote total équivaut à l'azote aminé ; de même pour la cystine et la lysine comportant deux groupements aminés, et deux atomes d'azote.

Pour l'histidine et l'arginine par contre, les quantités d'azote rapportées sont supérieures à celles de l'azote aminé proprement dit puisque pour deux groupements aminés, l'histidine contient au total trois et l'arginine quatre atomes d'azote. De même pour les amides contenant deux atomes d'azote dont un seul appartient au groupement amidé.

L'azote présent dans les vins sous forme d'acides aminés et d'amides libres a donc été estimé en faisant la somme des équivalents respectifs ; c'est ce poids d'azote qui figure au bas de chaque colonne dans la partie droite du tableau II.

Pour une meilleure interprétation des résultats ainsi obtenus, ces teneurs ont été reportées sur le tableau I et exprimées d'une part en mg d'azote par litre, d'autre part en p. 100 de l'azote total.

Une première constatation s'impose : les teneurs des vins en azote aminé déterminées par formoltitration sont toutes nettement inférieures à celles obtenues à partir des résultats chromatographiques. Or, dans les deux cas, les déterminations quantitatives ont été effectuées à partir du même extrait obtenu après fractionnement des vins sur résine échangeuse de cations. Il faut donc en conclure que la formoltitration ne permet pas de doser la totalité des constituants aminés du vin, et qu'en conséquence, elle conduit à des résultats erronés.

Il apparaît d'autre part que la détermination de l'azote amidé, par dosage direct de l'asparagine et de la glutamine séparées par chromatographie, constitue une méthode plus sûre que les déterminations classiques fondées sur la labilité du groupement amidé.

Si donc, en ce qui concerne les formes aminées et amidées des vins, on ne considère comme valables que les seules valeurs obtenues après analyse chromatographique, on peut alors déterminer par différence les teneurs des vins en constituants azotés mineurs, c'est-à-dire la somme azote ammoniacal, polypeptidique, protéique et non protéique. Les teneurs ainsi obtenues figurent également sur le tableau I.

Quant à la fraction azotée précipitable par l'acide phosphotungstique, la comparaison des résultats obtenus sur le vin n° 2 démontre la complexité de son interprétation. Le réactif précipite 64,4 mg d'azote, soit 29,7 p. 100 de l'azote total. Par ailleurs, l'azote apporté par la cystine, l'arginine, l'histidine et la lysine s'élève à 56,6 mg par litre soit 26,1 p. 100 de l'azote total. Si l'on admet que les acides diaminés ont été précipités quantitativement, la fraction azotée représentée par les polypeptides et éventuellement par les protéines ne constituerait en fait que $64,4 - 56,6 = 7,8$ mg d'azote par litre soit 2,6 p. 100 de l'azote total. Or

le calcul par différence des fractions azotées non aminées et non amidées indique 0,6 mg d'azote par litre, soit 0,4 p. 100 de l'azote total (tableau I). Pour le vin n° 3, au contraire, on précipite 82,6 mg d'azote, alors que l'azote apporté par les acides diaminés représente 202,8 mg par litre.

Quels renseignements nous fournissent alors les résultats déduits de l'analyse chromatographique ?

Tout d'abord, que les vins ayant été au contact prolongé avec les levures sont beaucoup plus riches en acides aminés libres que les vins préparés dans des conditions normales, et l'on retrouve ici les différences déjà signalées pour l'azote total. C'est ainsi que le vin rouge de lies n° 1 contient 1,7 fois plus d'azote sous forme d'amino-acides que le vin témoin ; il contient également deux fois plus d'azote à l'état de glutamine et d'asparagine. De même le Château-Châlon, dont la teneur en azote sous forme d'amides est égale à celle du vin blanc témoin renferme 1,6 fois plus d'azote « amino-acides » libres. L'influence exercée par les levures autolysées sur la concentration des vins en acides aminés et amides libres est donc évidente.

Cette influence apparaît également marquée, dans le cas des vins rouges, en ce qui concerne leur teneur en constituants azotés à plus grosses molécules. Comparée à celle du vin ordinaire n° 2, la fraction azotée du vin de lies n° 1, représentant outre l'ammoniaque libre, les composés organiques plus condensés, apparaît considérable. Si l'on tient compte du temps relativement court pendant lequel le vin est demeuré au contact des lies, il est probable que cette fraction est constituée pour la plus grande part de composés de nature peptidique, résultant d'une dégradation incomplète des protéines cellulaires des levures. On ne retrouve pas cette différence de composition entre le Château-Châlon et le vin blanc témoin qui présentent une teneur sensiblement égale en azote « résiduel » ; si l'on considère que la préparation des vins jaunes du Jura fait intervenir un séjour sur les lies de plusieurs années, on peut admettre que la dégradation par autolyse du matériel protéique des levures a été suffisamment poussée pour qu'aucun composé de nature peptidique ne subsiste dans le milieu.

Parallèlement aux teneurs des vins en leurs diverses fractions azotées, nous avons rapporté dans le tableau I leurs proportions respectives exprimées en p. 100 de l'azote total. Les bilans en azote ainsi obtenus semblent rendre compte de façon satisfaisante de la composition des vins en constituants azotés. L'importante proportion de composés azotés organiques de nature indéterminée qui ressortait lorsque les bilans étaient établis d'après l'azote aminé déterminé par formoltitration n'apparaît plus lorsque l'on considère les équivalents en azote des amino-acides et des amides libres calculés à partir des données chromatographiques.

Exprimée sous cette forme, la composition azotée des vins révèle

l'importance prépondérante des acides aminés libres dont l'azote constitue plus de 90 p. 100 de l'azote total. Seul le vin de lies n° 1 ne renferme que 57 p. 100 de son azote total sous forme d'amino-acides libres. Cette proportion plus faible est compensée par l'importance de la fraction azotée « résiduelle » qui constitue 35 p. 100 de l'azote total. Cette fraction azotée, supposée être de nature peptidique pour le vin rouge de lies apparaît en revanche peu importante pour les autres vins où elle ne représente que de 0,4 à 3,3 p. 100 de l'azote total. Il semble pour les vins 2, 4 et 5 que la nature ammoniacale de cet azote résiduel ne puisse être mise en doute. En effet, déterminée par voie chimique, la teneur en azote ammoniacal du vin n° 5 représente 3,3 p. 100 de son azote total ; or, l'azote résiduel calculé par différence représente le même pourcentage. Nous avons vu par ailleurs que l'azote non protéique se trouvait dans les vins à l'état de traces sous forme de bases puriques et pyrimidiques et qu'en conséquence, il est sans influence sur les bilans établis.

Enfin, l'azote présent à l'état d'amides libres constitue selon les échantillons entre 3,7 et 9,5 p. 100 de l'azote total. Il semble que cette forme d'azote soit en proportions moindres dans les vins blancs que dans les vins rouges, mais il n'apparaît pas de différences sensibles entre les vins témoins et ceux ayant séjourné au contact des levures.

Tout en démontrant l'influence que la dégradation autolytique des cellules de levure peut exercer sur la teneur des vins en acides aminés libres et éventuellement en constituants azotés plus complexes, les résultats de ce travail apportent donc d'un point de vue plus général, certaines précisions sur la composition azotée des vins. S'il peut exister dans certains vins des composés azotés de nature inconnue, ceux-ci ne peuvent constituer 40 à 50 p. 100 de l'azote total, comme l'indiquaient nos résultats préliminaires et comme l'indiquent également la plupart des bilans en azote établis jusqu'à présent par d'autres auteurs. L'important déficit en azote qui subsiste après analyse des diverses formes azotées semble bien devoir être attribué à une détermination erronée de la fraction aminée. Seule, une méthode permettant l'isolement et le dosage de chaque acide aminé présent offre la possibilité d'aboutir à des bilans azotés significatifs.

Ce travail aura également permis de montrer que certains procédés de vinification, favorisant l'accumulation des produits de dégradation cellulaires des levures, se traduisent par une amélioration sensible de la valeur biologique des vins. On assiste non seulement à un accroissement notable de la teneur en azote aminé, mais aussi à un enrichissement important en certaines formes aminées indispensables, telles que la lysine, l'arginine, l'histidine ou la méthionine.

III. — CONCLUSIONS

Des résultats qui viennent d'être présentés et de l'interprétation qui en a été faite, les conclusions suivantes peuvent être dégagées.

Les techniques de vinification qui font intervenir un contact prolongé du vin et des lies et favorisent l'accumulation des produits de dégradation autolytique des levures, se traduisent par un enrichissement en phosphore et en azote des vins obtenus.

L'accroissement de la teneur en phosphore intéresse surtout les constituants minéraux du vin ; orthophosphates et éventuellement méta ou pyrophosphates. L'enrichissement en phosphore organique est cependant assez sensible pour le vin de Château-Châlon. Une analyse partielle des constituants phosphorés organiques a permis de constater l'absence totale de nucléosides phosphates et de mettre en évidence l'acide glycérophosphorique.

L'augmentation de la teneur en azote des vins, consécutive à l'autolyse des levures, résulte principalement d'un accroissement de la concentration en acides aminés libres et, lorsque le contact du vin et des lies est relativement court, en constituants azotés de nature apparemment peptidique.

Le contact plus ou moins prolongé des levures autolysées et du vin ne modifie pas sa composition qualitative en acides aminés. Il se traduit en revanche par un accroissement notable de la concentration des acides aminés présents ; l'accumulation de certains acides aminés indispensables tels que l'arginine, la lysine, l'histidine et la méthionine améliore la valeur biologique des vins ainsi traités.

Enfin l'absence de nucléosides et de nucléotides et la présence à l'état de traces de bases puriques et pyrimidiques témoigne d'une dégradation poussée des constituants nucléiques des levures.

D'un autre point de vue, les résultats obtenus dans cette étude permettent de formuler diverses observations d'ordre analytique concernant la composition des vins en constituants azotés.

Lorsque, parallèlement aux diverses formes azotées, on détermine quantitativement l'azote aminé par formoltitration, les bilans en azote obtenus font apparaître que 40 à 50 p. 100 des constituants azotés du vin demeurent indéterminés.

Au contraire, si après séparation chromatographique, on détermine individuellement la concentration de chaque acide aminé et par suite son équivalent en azote, on aboutit à des proportions en azote de beaucoup supérieures à celles obtenues par formoltitration.

Il s'ensuit que la formoltitration ne constitue pas une méthode exacte de détermination de l'azote des acides aminés libres des vins et que

les bilans azotés établis dans ces conditions sont obligatoirement déficitaires.

Les observations de SISAKIAN et coll. (34, 35) selon lesquelles la détermination des acides aminés séparés par chromatographie conduit à des teneurs en azote aminé plus élevées que celles obtenues selon la technique de VAN SLYKE, semblent appuyer pleinement nos propres conclusions.

Il y a donc tout lieu de penser que les composés azotés de nature inconnue dont la présence dans certains vins a été admise par divers auteurs (23, 24, 25) sont constitués, au moins partiellement, d'une partie de l'azote aminé libre que les méthodes classiques d'analyse ne permettent pas de doser.

Il convient toutefois de tenir compte de la présence possible de composés analogues à ceux isolés de vins mousseux par OPARIN et coll. (22) et résultant de réactions complexes entre les sucres et les amino-acides ou certaines formes azotées moins simples. Il est même sans doute permis de supposer que des substances de ce type seraient peut-être à l'origine des perturbations constatées dans la détermination quantitative de l'azote aminé par les méthodes classiques.

De toute façon, même si de telles substances sont effectivement présentes dans les vins du type de ceux analysés dans ce travail, il est vraisemblable qu'elles ne s'y trouvent qu'à l'état de traces.

En fait, telle qu'elle a été conduite expérimentalement, cette étude fait apparaître que les vins rouge et blanc de consommation courante présentent une composition azotée relativement simple dans laquelle les acides aminés libres constituent 90 à 91 p. 100 de l'azote total, les amides libres de 6 à 9 p. 100, l'ammoniaque et l'azote non protéique de 0,4 à 3,3 p. 100.

Pour le vin de Château-Châlon, dont la préparation fait intervenir une dégradation totale des constituants cellulaires des levures, les proportions des différentes formes azotées sont sensiblement les mêmes. Au contraire, dans le vin rouge de lies, où les processus protéolytiques ont été moins poussés, les acides aminés libres ne représentent que 57 p. 100 de l'azote total, alors que l'azote peptidique atteint près de 35 p. 100.

En définitive, il semble qu'associée aux techniques de détermination des formes peptidiques ou protéiques éventuellement présentes, une méthode permettant l'isolement et le dosage individuel des amino-acides et des amides puisse conduire à une détermination significative des constituants azotés des vins.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Almeida (H. de). — Estudo polarografico de algunas proteinas puras. *Anais Inst. Vinho Porto*, **9**, 17, 1948.

(1 *bis*) Almeida (H. de). — (En portugais). Caractérisation des acides aminés dans le vin de Porto. Analyse chromatographique à l'aide des résines échangeuses d'ions. *Anais Inst. Vinho Porto*, **15**, 1, 1954.

(2) Amerine (M. A.). — Composition of wines Chapt IX. Nitrogenous Compounds. *Adv. Food Res.*, **5**, 448, 1954.

(3) Bandurski (R. S.) et Axelrod (B.). — The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, **193**, 405, 1951.

(4) Barbera (G.). — Sulla sostanze estrattive dei vini II. Componenti nitrogeni. *Ann. Chim. Appl.*, **23**, 115, 1933.

(5) Bourdet (A.). — Les constituants puriques et pyrimidiques des levures et la dégradation autolytique de l'acide ribonucléique. *Ann. Technol. Agric.*, S^ie^ E, n° hors série , 1957.

(6) Carles (P.). — Les combinaisons phosphorées des vins. *Bull. Soc. Chim.*, France, 4e S^ie^, n° 18-19, 962, 1909.

(6 *bis*) Castor (J. G. B.). — Biochemical events during vinous fermentation. *Proc. Am. Soc. Enologists*, 21 et 104, 1950.

(7) Castor (J. G. B.). — The free amino-acids of musts and wines. *Food Research*, **18**, 139 et 146, 1953.

(8) Castor (J. G. B.) et Guymon (J. F.). — On the mecanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation. *Science*, **115**, 147, 1952.

(9) Deibner (L.) et Bouzigues (H.). — Dosage de l'anion ortho-phosphorique dans les vins par le procédé électrophotométrique au bleu phosphomolybdique. *Ann. Technol. Agric.*, **4**, 309, 1955.

(10) Filteau (G.) et Martel (F.). — Analyse quantitative des acides aminés libres du sérum sanguin par chromatographie bidimensionnelle sur papier filtre. *Rev. Canad. Biol.*, **15**, 212, 1956.

(11) Fleury (P.) et Joly (M.). — Séparation de l'inositol d'avec le glucose et dosage. *J. Pharm. Chim.*, **26**, 341 et 397, 1937.

(12) Fleury (P.) et Recoules (A.).— Dosage chimique de l'inositol en présence des glucides. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **31**, 256, 1949.

(13) Garcia de Angulo (J. R.) et Freyre (E.). — Notas de un metodo para determination del nitrogeno total en mostos y vinos por colorimetria. *Bol. Inst. Nac. Invest. Agro. Spain*, **11**, 403, 1951.

(14) Hanes (C. S.) et Isherwood (F. A.). — Separation of the phosphoric esters on the filter paper chromatogram. *Nature*, **164**, 1107, 1949.

(15) Hennig (K.).— Einige Fragen zur Bilanz der Stickstoffverbindungen im Most und Wein. *Z. Lebens Unters Forsch*, **87**, 40, 1944. Voir aussi *Bull. Off. Intern. Vin*, **16**, 82, 1943.

(16) Hogstrom (G.). — Paper chromatography of Amino-acids, sugars and acids. *Acta Chem. Scand.*, **11**, 743, 1957.

(17) Luthi (H.) et Vetsch (U.). — Papier chromatische Bestimmung von Aminosäuren in Weinen. *Schweiz Z. Obst Weinb.*, **61**, 390 et 405, 1952.

(18) Marco-Soave. — Sul fosforo organico nei vini. *Staz. Speriment. Agrar. Ital.*, **39**, 438, 1906.

(19) Mestre (A. C.) et Mestre (J. A.). — Estudio comparativo de fermentaciones de mosto a moderadas y bajas temperaturas. *Bol. Inst. Nac. Invest. Agron. Spain*, **2**, 31, 1939.

(20) Muth (F.) et Malsch (L.). — Versuche zur Aufstellung einer Stickstoffbilanz in Traubemosten und Weinen. *Z. Unters Lebensm.*, **68**, 487, 1934.

(21) Niehaus (C. J.). — The nitrogen content of South Africa musts and wines. *Sci. Bull. Dpt Agr. S. Africa*, **172**, 1, 1938.

(22) Oparin (A. I.) et Bezinger (E. N.). — (En russe). Les constituants azotés du vin I. Composés azotés de poids moléculaire élevé dans le « champagne ». *Biokhimiya*, **14**, 291, 1949.
(23) Oparin (A. I.), Bezinger (E. N.) et Batsyna (I.). — (En russe). Transformation des substances azotées du « champagne » au cours de sa fabrication. *Biokhimiya*, **10**, 311, 1945.
(24) Oparin (A. I.), Kursanov (A. L.), Saenko (N. F.) et Bezinger (E N.). — (En russe). Processus biochimiques dans le « champagne » au cours de la fermentation secondaire. *Vinodel-Vinograd SSSR*, **6**, 12, 1946.
(25) Oparin (A. I.), Kursanov (A. L.), Saenko (N. F.) et Bezinger (E. N.). — (En russe). Processus biochimiques dans le « champagne » pendant la maturation après la mise en bouteille. *Biokhim-Vinod*, **1**, 134, 1947.
(26) Peynaud (E.). — L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. *Ann. Fals. Fraudes*, **32**, 228, 1939 et *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **6**, 784, 1939.
(27) Peynaud (E.). — *a*) Analyse complète de 12 vins de Bordeaux ; *b*) Analyse complète de 8 vins doux naturels. *Ann. Agron.*, S^ie^ A, **1**, 252 et 382, 1950.
(28) Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — L'inositol dans les raisins et dans les vins. Son dosage microbiologique. *Ann. Techn. Agricole*, S^ie^ E, **4**, 381, 1955.
(29) Redfield (R. R.). — A two dimentionnal paper chromatographic method with a high resolving power for separating amino-acids. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 344, 1953.
(30) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **6**, 787, 1939.
(31) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Analyse et Contrôle des vins. Béranger Éditeur, Paris, Liège, 1947.
(32) Schanderl (H.). — Die Mikrobiologie des Weines. E. Ulmer Edr Stuttgart, 1950.
(32 *bis*) Semichon (L.). — Sur la composition des vins de lie et des lies de vins. *C. R. Acad. Sc.*, **174**, 1179, 1922.
(33) Shcherbakov (M. F.). — (En russe). Méthode de dosage des composés azotés. *Vinod Vinograd SSSR*, **1**, 8, 1940 dans *Chem. Abstr.*, **37**, 2877, 1943.
(34) Sisakian (N. M.) et Bezinger (E. N.). — (En russe). Séparation et dosage des acides aminés des vins. *Doklady Akad Nauk SSSR*, **69**, 572, 1949.
(35) Sisakian (N. M.) et Bezinger (E. N.). — (En russe). Acides aminés dans les vins de raisin. *Biokhimiya Vinodel*, **3**, 185, 1950.
(36) Thompson (J. F.), Zacharius (R. M.) et Steward (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure. *Plant Physiol.*, **26**, 375, 1951.
(37) Valaize (H.) et Dupont (G.). — Les acides aminés et le bouquet des vins. *Ind. Agr. Alim.*, **68**, 245, 1951.
(38) Ventre (J.). — Recherches sur les formes possibles du phosphore dans les raisins et dans le vin. Thèse, Goulet, Edr, Montpellier, 1910.
(39) Wade (H. E.) et Morgan (D. M.). — Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. *Biochem. J.*, **60**, 264, 1955.

INTERPRÉTATION DES COURBES D'ABSORPTION DES VINS ROUGES

PAR

P. SUDRAUD

Station agronomique et œnologique, Bordeaux

La couleur constitue un facteur important dans l'appréciation des aliments en général et des vins en particulier. En effet le consommateur et à plus forte raison l'œnologue et le dégustateur attachent une si grande importance à la couleur d'un vin que l'on a dit souvent qu'un vin est d'abord « bu avec les yeux » ou que l'appréciation visuelle est le premier élément de la dégustation. De même le propriétaire et le négociant élèvent toujours leurs verres vers la lumière afin d'apprécier la couleur du vin avant de le sentir et la première impression visuelle influence souvent l'appréciation finale.

D'autre part pour l'œnologue, la coloration d'un vin, sa nuance et son intensité, sont bien l'un des caractères de ce vin concourant à sa définition. La couleur évolue en effet selon les conditions de vinification et de conservation et ce sont les relations entre ces conditions et la couleur qui l'intéressent au même titre que, par exemple, les relations entre les conditions de vinification et de conservation et le taux d'acidité volatile. C'est cette évolution de la couleur qui intéresse l'œnologue et le technicien du vin mais on ne peut aborder cette étude que si l'on possède un moyen de définition suffisamment précis de la couleur, de son intensité et de sa nuance. C'est l'objet du présent travail.

Nous observons dès maintenant que la couleur n'est pas une constante d'un vin ; qu'elle varie notamment avec son état d'aération ou de repos à l'abri de l'air ; de même que pour un état d'aération donné, elle évolue en fonction du temps et de divers traitements. Pour éliminer le plus possible l'influence de l'aération, nous avons opéré sur des vins en bouteilles, débouchées au moment des mesures.

La couleur en général est représentée par trois qualités fondamentales :
— l'intensité ou force de la coloration,
— la nuance ou teinte,
— l'éclat ou brillant.

Dans le cas de vins rouges, on peut éliminer la considération de l'éclat, en opérant toujours sur des vins parfaitement limpides, et ne chercher à définir que la nuance et l'intensité en les représentant par des chiffres car il est difficile de traduire par des mots et plus encore par des chiffres l'impression visuelle perçue par la rétine et enregistrée par le cerveau.

Parmi les nombreuses méthodes citées par NÈGRE (1) pour chiffrer la couleur d'un vin aucune n'est parfaite, pas plus que la séparation par les solvants de la matière colorante d'un vin.

Le vino-colorimètre de SALLERON, appareil très ancien, est peu utilisé car les résultats varient avec l'opérateur.

Les échelles colorantes obtenues en combinant des solutions de bichromate et de permanganate de potassium (2) ne sont pas très stables et donnent des résultats peu précis.

Les mesures photocolorimétriques sont plus précises et semblent donner de meilleurs résultats. La méthode de FAURE et PALLU (3) ne tient compte que de l'intensité colorante ; celle de COLLET (4) tient compte à la fois de la teinte et de l'intensité mais elle est assez compliquée, de même que la détermination des indices selon MARSH (5). La méthode de BOUTARIC, FERRE et Mme ROY (6) est certainement la meilleure jusqu'à maintenant ; les auteurs ont en effet remarqué que le vin ne peut être dilué, même par une solution hydroalcoolique de même pH, sans enfreindre la loi de BEER ; ils ont défini la nuance par un rapport des densités optiques correspondant à deux longueurs d'onde bien définies mais n'ont pas étudié de vins vieux.

Nous avons repris ces mesures photocolorimétriques dans le spectre visible (l'étude du spectre ultra-violet des vins est également commencée) en utilisant un spectrophotomètre UNICAM S P 600 à optique de verre à l'aide de cuves de 1 mm d'épaisseur. Pour des longueurs d'onde allant de 360 à 650 mμ nous avons ainsi tracé les courbes d'absorption d'un grand nombre de vins, différant par l'âge et l'origine, en portant les longueurs d'onde en abscisses et les densités optiques en ordonnées.

Influence de l'âge du vin.

Comme le montrent les courbes d'absorption tracées sur la figure 1, on obtient des résultats très différents avec des vins rouges d'âges différents ; par contre ces courbes sont assez semblables pour différents vins du même âge. Les vins jeunes présentent un minimum aux environs de 420 mμ et un maximum vers 520 mμ. Quand le vin vieillit ces minima deviennent de moins en moins nets, disparaissent en laissant place à un palier plus ou moins long qui disparaît à son tour pour donner dans le cas des vins très vieux une courbe continuellement descendante avec un point d'inflexion.

Une idée assez exacte de la nuance de la coloration d'un vin rouge peut nous être fournie par le rapport des densités optiques relatives aux longueurs d'onde 420 et 520 mμ.

$$T = \frac{D_{420}}{D_{520}}$$

En effet ce rapport indique l'absorption dans le bleu par rapport à l'absorption dans le vert c'est-à-dire la richesse du vin en couleur jaune par rapport à sa richesse en couleur rouge pourpre. C'est ainsi que ce

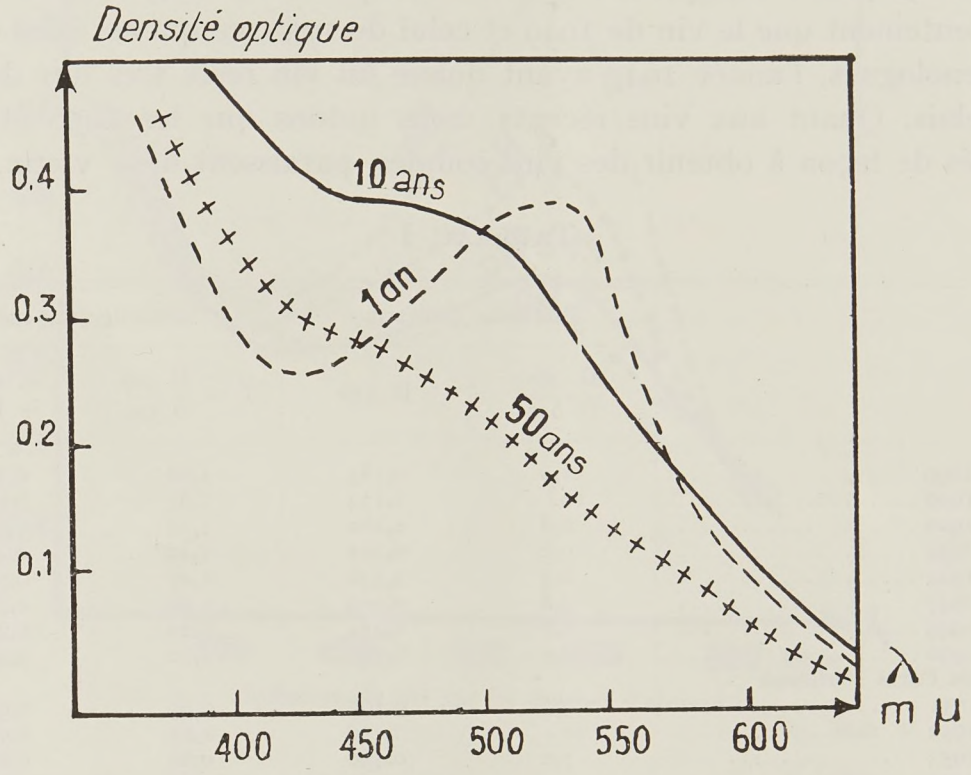


FIG. 1. — Courbes d'absorption de 3 vins rouges d'âges différents.

rapport est faible pour un vin jeune de coloration rouge franc et élevé pour un vin vieux, très « tuilé », où la teinte jaune est importante par rapport à la nuance rouge.

Quant à l'intensité colorante, il ne semble pas que l'on puisse la représenter par une seule densité optique, la sensibilité de l'œil n'étant pas la même pour toutes les longueurs d'onde. Si l'on prend la densité optique de 520 mμ, les vins jeunes auront une intensité colorante élevée puisque pour cette longueur d'onde, leur courbe d'absorption présente un maximum alors que des vins vieux, très « tuilés », paraissant avoir une intensité colorante très forte, auront un chiffre assez faible, leur densité optique à 520 mμ étant faible. C'est le cas du vin de 1945 (10 ans) dont la courbe d'absorption est représentée sur la figure 1 comparativement à un vin de 1955 (1 an). Il semble donc logique de définir l'intensité

de la coloration d'un vin comme la somme des densités optiques relatives à 420 mμ et à 520 mμ.

$$I = D_{420} + D_{520}$$

Nous avons rassemblé dans le tableau I pour des vins d'âges très différents la teinte et l'intensité déterminées suivant le rapport préconisé par BOUTARIC et les chiffres obtenus selon les équations ci-dessus. Nous voyons que l'indice T varie d'une manière assez significative selon l'âge du vin alors que les déterminations selon la méthode de BOUTARIC donnent des valeurs ne variant sensiblement pas avec le vieillissement. Sur ce tableau nous remarquons en particulier que le vin 1947 semble vieillir plus lentement que le vin de 1949 et celui de 1950, ce qui est bien connu des œnologues, l'année 1947 ayant donné un vin resté très dur dans le Bordelais. Quant aux vins récents, nous notons que les 1956 étudiés, vinifiés de façon à obtenir des vins souples, paraissent déjà vieux.

TABLEAU I

	Méthode Boutaric		Méthode proposée	
	$\frac{D\ 480}{D\ 640}$	D 520	$T = \frac{D\ 420}{D\ 520}$	$I = D\ 420 + D\ 520$
Médoc 1899	11,2	0,185	1,68	0,495
— 1900	10	0,174	1,67	0,464
— 1920	8,8	0,200	1,54	0,508
— 1934	9,2	0,202	1,45	0,494
— 1945	8,3	0,336	1,22	0,746
— 1947	9,8	0,370	1,06	0,762
— 1949	8,7	0,224	1,22	0,499
— 1950	8,0	0,232	1,12	0,499
Premières Côtes Bordeaux				
1952	9,2	0,495	0,95	0,962
1952 + rafle	10	0,510	1,04	1,040
1953	7,2	0,450	0,89	0,850
1953 + rafle	7	0,392	0,98	0,777
1955 Cuvaison 4 jours	6,3	0,450	0,67	0,752
1955 — 4 jours + rafle	7,3	0,352	0,74	0,612
1955 — 8 jours	8,5	0,370	0,72	0,638
1955 — 16 jours	8,5	0,325	0,74	0,569
1956	6,5	0,272	0,92	0,522
1956 + rafle	7,0	0,324	0,93	0,624

Influence du mode de vinification.

Dans le tableau précédent, figurent des vins de Premières Côtes vinifiés différemment en particulier en présence ou en absence de rafles. Pour les quatre années envisagées, nous notons toujours que la présence de rafles semble avoir une influence sur la rapidité du vieillissement et la dégustation a parfaitement confirmé ces résultats à savoir : malgré un indice de permanganate élevé les vins vinifiés en présence de rafle sont souvent plus souples que les vins obtenus sans rafle et paraissent dans tous les cas nettement plus vieux au nez et au goût.

Influence du pH.

Il est bien connu qu'une addition d'acide fait virer la couleur du vin vers une teinte plus rouge franc et paraît augmenter son intensité colorante. Nous avons donc étudié les modifications de la courbe d'absorption d'un vin rouge de pH 3,45 en acidifiant ce vin par de l'acide chlorhydrique concentré ou en le neutralisant par addition de lessive de soude environ

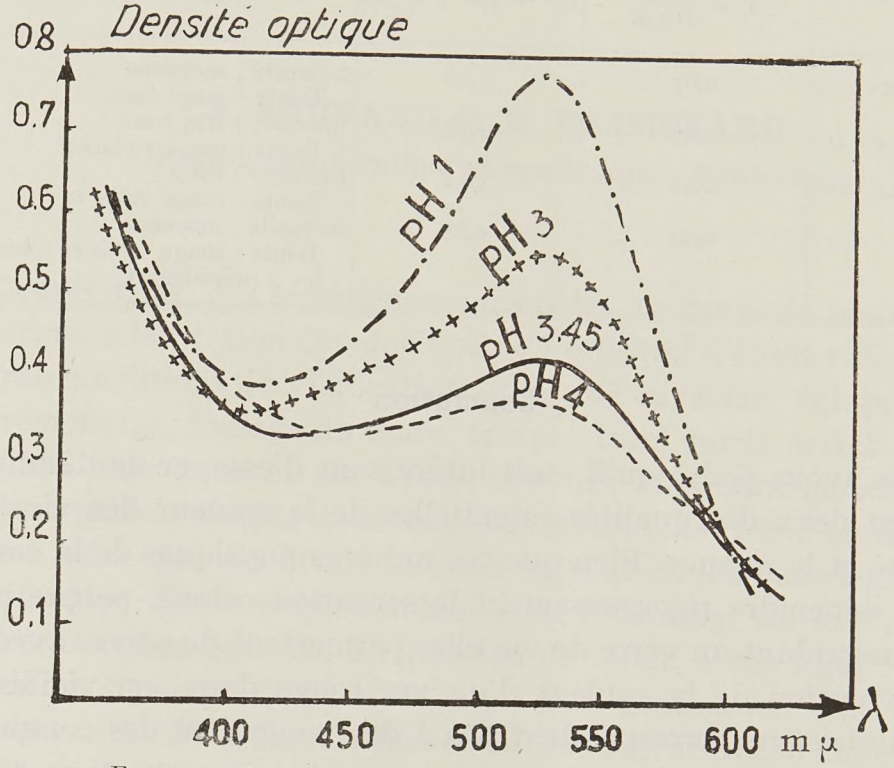


FIG. 2. — Influence du pH sur les courbes d'absorption.

10 N. Les courbes d'absorption correspondant aux pH 1, 3, 3, 45 et 4 sont représentées sur la figure 2.

Nous constatons qu'un abaissement du pH augmente l'intensité de la coloration et fait évoluer sa nuance vers le rouge franc. Remarquons qu'entre pH 3 et 4 une faible variation de pH peut avoir une grande influence sur l'évolution de la teinte ; c'est ce qui se produit lors de la fermentation malolactique qui élève le pH du vin de 0,1 environ et fait nettement virer sa nuance vers le « tuilé » (7).

Influence des cépages.

L'appréciation visuelle de la couleur semble indiquer que les hybrides producteurs directs donnent un vin plus rouge-violacé que les cépages nobles. L'étude des courbes d'absorption de ces vins confirme ces résultats les vins d'hybrides possédant des courbes présentant des minima et des maxima très nets. Le tableau II groupe les indices T et I relatifs à trois

vins d'hybrides de l'année comparativement à ceux d'un vin de cépages nobles de la même année ; dans tous les cas nous avons trouvé un indice T nettement inférieur pour les vins d'hybrides ce qui montre bien qu'ils possèdent une coloration rouge tirant plus sur le violacé que sur le jaune.

TABLEAU II

	$T = \frac{D\,420}{D\,520}$	$I = D\,420 + D\,520$	Appréciation visuelle
Cépage noble	0,67	1,00	Intensité : moyenne Teinte : rouge-franc
Hybride 1	0,49	1,30	Intensité : très forte Teinte : rouge-violacée
Hybride 2	0,49	1,14	Intensité : forte Teinte : rouge violacée
Hybride 3	0,54	0,88	Intensité : moyenne Teinte : rouge violacée (plus franc que les 2 précédents).

Conclusion

Nous avons pensé qu'il était intéressant d'essayer de définir numériquement deux des qualités essentielles de la couleur des vins rouges, l'intensité et la nuance. Bien que ces mesures physiques de la couleur ne puissent dépeindre rigoureusement la sensation colorée perçue par l'œil humain regardant un verre de vin elles permettent de suivre avec exactitude l'évolution de la couleur d'un vin rouge dans son vieillissement. Si ces mesures ne correspondent pas à des teneurs en des composés chimiques définis, elles possèdent une bonne valeur comparative et permettent de fixer par deux chiffres l'impression visuelle reçue ; d'autre part la mesure de la densité optique, pour les deux longueurs d'onde envisagées, est rapide et permet à l'œnologue de fixer approximativement le degré de vieillissement d'un vin. La détermination de ces deux indices pour la définition de la nuance et de l'intensité de la couleur d'un vin doit nous permettre une étude plus précise de l'évolution de la coloration d'un vin pendant la fermentation et la conservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) NÈGRE (E.). — Thèse de *Doctorat ès Sciences Physiques*, Montpellier, p. 80, 1944.
(2) MAURIE (A.). — *Bull. Off. Int. Vin*, sept.-oct. 1942.
(3) FAURE (A.) et PALLU (R.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, **28**, 5, 1935.
(4) COLLET. — Diplôme Supérieur de Pharmacie, Montpellier, 1939.
(5) MARSH (G. L.). — *American Society of Œnologist*, p. 62, 1952.
(6) BOUTARIC (A.), FERRE (L.) et ROY (Mme M.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, **30**, 196, 1937.
(7) RIBEREAU-GAYON (J.). — *Traité d'Œnologie*, p. 202, 1950.

INFLUENCE DE CERTAINES CONDITIONS DANS LA VINIFICATION EN ROUGE

PAR

P. SUDRAUD et R. CASSIGNARD

Station agronomique et œnologique, Bordeaux.

Depuis 1952, des expériences effectuées en cuves de petite capacité ont permis à la Station Œnologique de Bordeaux d'étudier l'influence de certaines conditions de vinification (durée de cuvaison, égrappage, sulfitage, remontage, foulage du marc, température) sur la marche de la fermentation alcoolique et sur l'évolution des vins correspondants (1-2). Mais il est parfois difficile dans ces essais semi-industriels d'étudier séparément les influences des divers facteurs entrant en jeu dans les opérations de vinification. Par exemple l'influence du remontage sur la marche de la fermentation peut être due à l'aération du moût, à son léger refroidissement ou au brassage de la cuve et à l'homogénéisation qui en résulte ; il sera donc utile d'étudier l'influence de l'homogénéisation et de l'aération sur la fermentation d'une même vendange rouge, soumise à divers traitements (éraflage, température, acidité, sulfitage, etc.).

Matériel utilisé.

L'étude d'un grand nombre de facteurs, imbriqués les uns dans les autres, étant pratiquement impossible à réaliser en cuves, nous avons été amenés à effectuer ces essais sur de petits volumes, permettant de multiplier les variables étudiées, tout en nous plaçant le plus possible dans les conditions de la pratique. Les récipients utilisés étaient constitués par des flacons d'une contenance de un litre, à large ouverture permettant l'introduction et l'évacuation du marc, et fermés soit par un tampon d'ouate serré, soit par un bouchon de caoutchouc relié à un barboteur à eau (fig. 1). Cette expérience a été effectuée avec de la vendange rouge de la région des Premières côtes de Bordeaux 1957, très mûre et très saine, constituée par du cépage Merlot. Afin d'avoir des échantillons homogènes, cette vendange éraflée était foulée à la main et égouttée pour déterminer les poids respectifs du moût et du marc ; chaque flacon recevait 375 cm³

de moût et 335 g de marc égoutté (les échantillons vinifiés en présence de rafle en ont reçu 40 g).

La densité initiale du moût était de 1090 (soit 11°9) et son acidité totale initiale de 5,25 g par litre.

Les conditions de l'expérience étaient les suivantes :

Fermeture ouate			Fermeture barboteur					
Macération 9 jours			Macération 9 jours			Macération 23 jours		
Au repos	Aérés	Homogénéisés	Au repos	Aérés	Homogénéisés	Au repos	Aérés	Homogénéisés

Pour chacune de ces neuf conditions on préparait six flacons : un maintenu à température normale (15° environ) et cinq maintenus à l'étuve

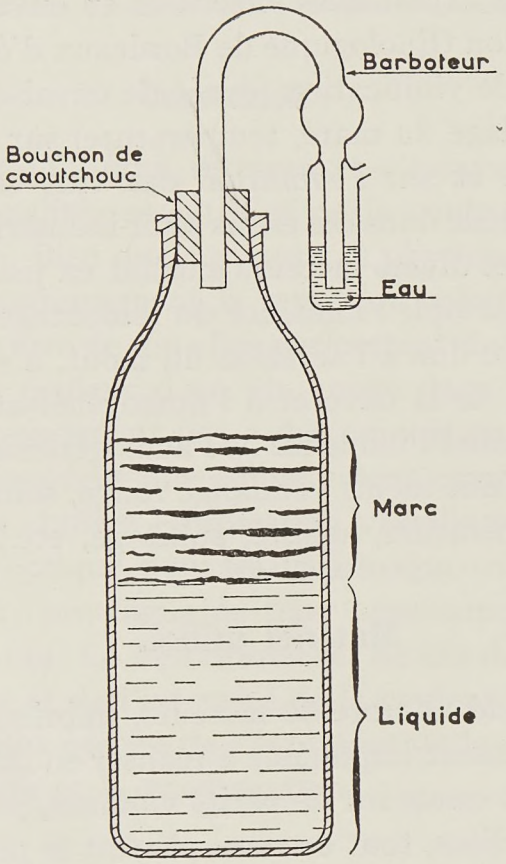


Fig 1. — Flacon de fermentation.

à 30° : témoin, avec rafle, avec 2 g par litre d'acide tartrique, avec 2 g par litre de carbonate de calcium, avec 150 mg par litre d'anhydride sulfureux.

Les flacons « aérés » étaient saturés d'oxygène, les deuxième et cinquième jour de la fermentation, par double transvasement du jus après désagrégation partielle du chapeau.

Les flacons « homogénéisés » étaient agités fortement, aux mêmes moments, en les maintenant fermés, après avoir brisé le chapeau avec un

agitateur. Les flacons « aérés » se trouvaient être moins complètement homogénéisés que les flacons « homogénéisés » qui n'étaient pas aérés. La différence essentielle entre ces deux traitements réside donc dans l'aération. Notons dès maintenant que ces homogénéisations et aérations ont été effectuées le même jour, mais non à la même densité, en particulier, le deuxième jour, avant le départ de la fermentation pour les moûts sulfités et maintenus à 15° et, le cinquième jour, vers la fin de la fermentation, pour tous les échantillons maintenus à 30°.

Enfin certaines séries étaient pressées (à la main à l'aide d'une toile de nylon) pour séparer le vin du marc au bout de neuf jours, soit deux ou trois jours après la fin de la fermentation alcoolique, tandis que d'autres étaient abandonnées quatorze jours de plus avant d'être pressées ; autrement dit les durées de macération, ou de cuvaison, étaient respectivement de neuf et vingt-trois jours.

La fermentation alcoolique était suivie quotidiennement par la pesée des flacons ; on traçait ainsi les courbes de fermentation, puis après pressurage, on examinait et analysait les vins obtenus. C'est le résultat de ces essais que nous exposons.

Influence des aérations, des homogénéisations et de la température.

La vitesse de la *fermentation alcoolique* des échantillons à 30° n'est pas plus grande et le taux de sucre résiduel n'est pas plus faible dans les flacons à fermeture ouate que dans les flacons fermés par barboteur, et pas plus dans les flacons laissés au repos ou homogénéisés sans aération. Par contre à 15°, l'homogénéisation et l'aération ont un effet activeur important (sans diminution du taux de sucre résiduel). Ces différences observées en fonction de la température nous montrent que les aérations ont été faites trop tard à 30° ou bien qu'elles sont moins efficaces à température élevée, alors qu'elles ont eu leur pleine action à 15°.

La *fermentation malolactique* est favorisée par le repos car dans les échantillons désacidifiés et maintenus au repos elle est complète alors qu'elle est seulement commencée dans les échantillons aérés ou homogénéisés.

La dissolution des *composés phénoliques*, représentée d'une façon globale par l'indice de permanganate, est très différente dans les séries reposées, aérées ou homogénéisées. Le tableau suivant donne pour la fermentation en flacons bouchés ouate, les indices de permanganate des échantillons à 30° et à 15° :

	Au repos	Aérés	Homogénéisés
30°	63	61	67
15°	46	50	51

A 30°, les aérations n'augmentent pas le taux de composés phénoliques dissous, probablement parce que la dernière aération a eu lieu à la

fin de la fermentation et a permis une oxydation notable des polyphénols. A 15°, les aérations et les homogénéisations ont donné approximativement le même enrichissement en composés phénoliques.

En moyenne dans cette expérience une homogénéisation augmente le taux de composés phénoliques de 6 à 10 p. 100 ; l'anaérobiose complète l'élève de 1 à 3 p. 100 ; à 15° on trouve un taux de composés phénoliques égal à 75 ou 80 p. 100 de celui obtenu à 30°.

Intensités colorantes.

	Fermeture ouate			Fermeture barboteur		
	Au repos	Aérés	Homogénéisés	Au repos	Aérés	Homogénéisés
30°	1,75	1,64	1,84	2,02	2,17	2,22
15°	1,36	1,54	1,60	1,54	1,58	1,70

Les *teintes* déterminées selon la méthode proposée par l'un de nous (3) sont sensiblement les mêmes quel que soit le degré d'aération ou la température. Par contre les *intensités colorantes* sont très différentes. Une homogénéisation augmente toujours l'intensité colorante de 6 à 10 p. 100 à 30°, de 10 à 15 p. 100 à 15°. La fermentation en anaérobiose complète (flacons bouchés avec barboteur) augmente l'intensité de 15 p. 100 environ par rapport à celle ayant lieu dans des flacons fermés par des tampons d'ouate. Les aérations en cours de fermentation augmentent l'intensité colorante, mais moins que les homogénéisations.

Influence de la durée de cuvaison.

L'influence de la durée de cuvaison a été l'objet de nombreuses discussions, mais on ne disposait pas d'observations précises sur l'épuisement des sucres en fonction de ce facteur. CHARPENTIE (4) avait observé que l'écoulage tardif favorise, avec l'épuisement des sucres, le déclenchement de la fermentation malolactique.

Ici, une prolongation de la cuvaison de quatorze jours diminue très légèrement le *sucre résiduel*, de 0,1 en moyenne, davantage dans des échantillons au repos ; dans les flacons homogénéisés et avec vingt-trois jours de macération, le taux élevé de composés phénoliques peut avoir une influence sur le dosage des substances réductrices par la méthode à la liqueur de FEHLING, peut-être par libération d'une petite quantité de sucre par hydrolyse ménagée des glucosides.

Comme le montre le tableau ci-après, la *fermentation malolactique* a lieu en totalité (un dosage de l'acide malique l'a confirmé) dans les échantillons restés vingt-trois jours en cuve à 30° et dans ceux-là seuls. Le contact du marc avec le moût semble donc favoriser cette désacidification.

Sucre résiduel et acidité totale.

	Cuvaison 9 jours						Cuvaison 23 jours					
	Au repos		Aérés		Homogénéisés		Au repos		Aérés		Homogénéisés	
	S	AT	S	AT	S	AT	S	AT	S	AT	S	AT
30°	2,1	5,2	2,1	5,3	2	5,4	1,8	4,7	2	4,5	2,2	4,5
15°	2,2	5,2	2	5,5	2	5,5	1,95	5,1	1,9	5,4	1,9	5,5

Une macération prolongée de quatorze jours, imitant les cuvaisons longues de la pratique, élève considérablement le taux de *composés phénoliques*, de 30 à 40 p. 100, mais diminue très sensiblement l'*intensité colorante* dans les séries à 30°. Ces résultats semblent montrer qu'une macération prolongée à température relativement élevée, tout en favorisant la dissolution des composés phénoliques, entraîne une précipitation des anthocyannes ou favorise une réaction entre les composés phénoliques incolores et les anthocyannes rouges. Ceci nous montre également que les colorants sont plus facilement extraits du marc que les composés phénoliques incolores. Une autre expérience nous a d'ailleurs permis de constater que si la dissolution des composés phénoliques augmentait toujours au cours de la macération, l'intensité colorante passe par un maximum, ce dernier étant d'autant plus rapidement atteint que la température de macération est plus élevée. Des faits analogues ont été constatés par Ferré (5).

Les *teintes* virent vers le « tuilé » après une macération prolongée ce qui montre bien que le pourcentage de colorants rouges diminue par rapport à celui des colorants jaunes.

Indice de permanganate et intensité colorante.

	Cuvaison 9 jours						Cuvaison 23 jours					
	Au repos		Aérés		Homogénéisés		Au repos		Aérés		Homogénéisés	
	Ind. MnO4K	Int. col.	Ind. MnO4K	Int. col.	Ind. MnO4K	Int. col.	Ind. MnO4K	Int. col.	Ind. MnO4K	Int. col.	Ind. MnO4K	Int. col.
30°	63	2,02	70	2,17	65	2,22	90	1,48	92	1,46	84	1,52
15°	45	1,54	50	1,58	48	1,70	65	1,53	68	1,43	69	1,56

Influence du traitement de la vendange.

La désacidification semble légèrement ralentir au départ la vitesse de la *fermentation alcoolique*, alors que l'addition de la rafle l'augmente toujours faiblement. Finalement, le taux de sucre des vins achevés étant compris entre 1,7 et 2,6, les taux les plus faibles sont obtenus avec désaci-

dification ou avec sulfitage, dans le cas de la fermeture par un tampon d'ouate, tandis que les taux les plus élevés sont obtenus en présence de rafle ou avec acidification. Dans le cas de la rafle l'excès observé est probablement dû à d'autres substances réductrices que du sucre fermentescible.

La *fermentation malolactique* ne s'est jamais produite dans les séries additionnées d'acide tartrique ou d'anhydride sulfureux, alors qu'elle s'est toujours produite dans les échantillons désacidifiés, même avec neuf jours seulement de macération. La présence de rafle ne modifie pas le comportement du moût qui n'est désacidifié que pour une macération prolongée.

Le sulfitage de la vendange, à la dose assez élevée de 0,15 g par litre augmente le taux de *composés phénoliques* de 3 à 10 p. 100, cette différence n'apparaissant d'ailleurs plus après vingt-trois jours de macération. Le taux de composés phénoliques est indépendant de l'acidité ; il est pratiquement le même dans les séries additionnées ou non d'acide tartrique ou de carbonate de calcium aux doses élevées de 2 g par litre. La rafle augmente le taux de composés phénoliques de 55 à 70 p. 100.

Les *teintes* des divers échantillons sont nettement différentes, les échantillons additionnés de rafle sont moins rouge-vif plus « tuilés » et encore plus ceux additionnés de carbonate de calcium. De même les échantillons additionnés d'acide tartrique ont la plus forte *intensité colorante*, alors que les échantillons additionnés de rafle et encore plus ceux additionnés de carbonate de calcium ont une intensité beaucoup plus faible. Le sulfitage avant fermentation ne change pratiquement pas la teinte et augmente légèrement l'intensité colorante.

Caractères gustatifs.

Une acidité élevée et une fermentation à basse température exaltent l'arôme de vin nouveau, alors que la désacidification diminue cette odeur en l'affinant : le vin a une « odeur souple ». Si on retarde la décuvaison cette infusion prolongée en milieu acide donne une odeur herbacée désagréable.

Le sulfitage avant fermentation donne une odeur de réduit, de mercaptan très prononcée dans les séries au repos, très atténuée par les aérations et les homogénéisations et disparaissant complètement par un retard à la décuvaison, même dans les bouteilles au repos. Ce retard à la décuvaison est donc plus efficace vis-à-vis de la disparition de ce goût et de cette odeur de mercaptan qu'une aération en cours de fermentation.

La rafle donne une odeur douce, caractéristique, légèrement herbacée, mais fine en un sens, et un certain fruité ; le vin est à la fois plus fait, plus mûr et plus âpre. Cette âpreté est très accrue lorsque l'on retarde la décu-

vaison ; dans une cuvaison courte le goût sucré apporté par la rafle compense son âpreté. Ainsi la présence de la rafle est d'autant plus nuisible que la cuvaison est plus longue, elle peut au contraire être favorable dans une cuvaison très courte.

Conclusions.

De cette expérience que nous avons voulue aussi complète que possible, mais qui est évidemment limitée à un certain type de vendange, nous pouvons tirer plusieurs conclusions susceptibles d'intéresser les praticiens, étant bien entendu que de tels essais doivent être renouvelés.

Les homogénéisations et aérations, qui peuvent être assimilées aux foulages du marc et remontages de la pratique, augmentent la quantité de composés phénoliques dissous, donc l'astringence, et l'intensité colorante sans en modifier la teinte ; elles défavorisent la fermentation malolactique et seules les aérations permettent une meilleure élimination des sucres.

Le retard à la décuvaison augmente fortement la quantité de composés phénoliques dissous, et par suite l'astringence, et favorise légèrement l'élimination du sucre. Si la température est suffisamment élevée, l'intensité colorante diminue et la fermentation malolactique est nettement facilitée.

La fermentation à basse température diminue la quantité de composés phénoliques dissous et l'intensité colorante ; un retard à la décuvaison ne semble pas activer à cette température le départ de la fermentation malolactique.

La présence de rafle augmente fortement l'astringence, surtout dans une cuvaison longue, en diminuant l'intensité colorante ; elle augmente également la quantité de sucre résiduel (ou du moins de substances réductrices).

La désacidification de la vendange favorise nettement le départ de la fermentation malolactique et diminue fortement l'intensité colorante du vin en faisant évoluer sa teinte vers le « tuilé ».

L'acidification de la vendange augmente l'intensité colorante du vin sans augmenter la quantité de composés phénoliques dissous, mais retarde (ou empêche) le départ de la fermentation malolactique ; il en est de même du sulfitage qui communique en outre au vin un goût et une odeur de mercaptan qui ne sont éliminés que par un retard à la décuvaison.

Pour obtenir le plus rapidement possible un vin souple et stable, c'est-à-dire pas trop riche en composés phénoliques, mais cependant suffisamment coloré, et exempt de sucre et d'acide malique, on a intérêt à partir d'une vendange peu acide, et non sulfitée, d'effectuer un égrappage complet, un remontage avec aération dès le second jour de la fermen-

tation et des cuvaisons pas trop courtes. Un écoulage en cuve ne permettant pas au vin de se refroidir aussi rapidement et le mélange du vin de goutte et du vin de presse sont à recommander.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Ribereau-Gayon (J. et P.). — Étude expérimentale de la vinification en rouge. *Chimie et Industrie*, **70**, 1953, 416 et 694 ; **72**, 1954, 922.
(2) Ribereau-Gayon (J.) et Sudraud (P.). — Étude expérimentale de la vinification en rouge. Expérimentation 1954. *Chimie et Industrie*, **79**, 1958, 302.
(3) Sudraud (P.). — Interprétation de la courbe d'absorption des vins rouges. *Annales de Technologie Agricole* (à paraître).
(4) Charpentie (Y.). — *Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins*. Thèse Ing. Docteur. Bordeaux, 1954.
(5) Ferre (L.). — Traité d'Œnologie Bourguignonne. *Bull. Institut Nat. Appellations d'Origine*, **58**, 1956, 59.

ABAQUE POUR LA DÉTERMINATION DU DEGRÉ ALCOOLIQUE PAR LA MÉTHODE CHIMIQUE

PAR

Pierre ANDRÉ

Station Centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne (Aude).

Suivant le mathématicien D'OCAGNE : « Si, à chacune des variables qui sont liées par une certaine équation, on fait correspondre un système d'éléments géométriques (points ou lignes) cotés au moyen des valeurs de cette variable, et que le lien établi par l'équation entre ces variables se traduise géométriquement par une certaine relation de position facile à constater entre les éléments géométriques correspondants, l'ensemble de ceux-ci constitue une *abaque* de l'équation considérée. »

Une abaque permet donc de remplacer les opérations arithmétiques usuelles par une détermination géométrique beaucoup plus rapide. Elle conduit donc à un gain de temps.

Le degré alcoolique d'un liquide, par la méthode sulfo-chromique est donné, après titrage par la résolution de l'équation :

$$D^0 = T\left(1 - \frac{n}{N}\right). \qquad (1)$$

D^0 représente le degré à déterminer.

T le titre de la solution de bichromate. Il est égal à 20 si celle ci contient par litre 33,805 g de $Cr_2O_7\,K_2$ (1).

n le nombre de ml de sulfate ferreux utilisés pour le dosage proprement dit.

N le nombre de ml de sulfate ferreux utilisés pour le dosage témoin.

La résolution de l'équation nécessite : une division, une soustraction, une multiplication. A l'aide d'une abaque on opérera beaucoup plus rapidement car on remplacera ces trois opérations par une détermination géométrique.

Le résultat sera tout aussi précis.

L'équation peut s'écrire sous la forme :

$$\frac{D^0}{T} = 1 - \frac{n}{N}$$

(1) Pour déterminer le degré alcoolique français (15°C/15°C).

Elle contient quatre variables (D, T, n, N) et ne pourra donc être résolue qu'à l'aide de deux abaques successives utilisant une variable commune auxiliaire :

$$1^{re} \text{ abaque} : \frac{n}{N} = X$$

$$2^{e} \text{ abaque} : \frac{D}{T} = Y \quad \text{avec} \quad Y = 1 - X$$

Les équations de ce type sont représentées d'une façon commode par les abaques à points alignés. Il est impossible de développer complète-

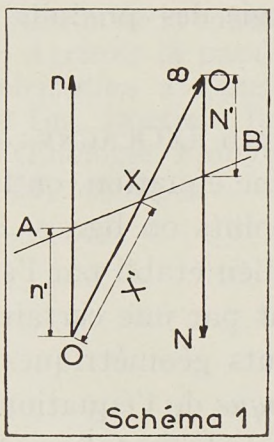


Fig. 1.

ment ici la théorie d'un tel type d'abaque. On la trouvera dans les ouvrages cités en référence.

Nous en indiquerons simplement le principe.

Si l'on considère l'équation :

$$\frac{n}{N} = X \quad \text{où} \quad n - NX = 0$$

Elle est représentée en coordonnées parallèles par trois droites (schéma 1).

— la droite On sens positif de bas en haut ;

— la droite ON, parallèle à On, sens positif de haut en bas ;

— la droite X, droite origine qui relie les points zéro des deux autres, son sens positif est de gauche à droite.

Si l'on coupe ces trois axes par une droite quelconque AB les abscisses n', N', X' vérifient la relation

$$n' - N' X' = 0 \quad \text{ou} \quad \frac{n'}{N'} = X'$$

Les graduations n, N le long des axes correspondants sont des graduations arithmétiques, et varient de 0 à la valeur maximum que l'on désire attribuer à la variable (par exemple $n = 40$ dans le cas de l'oxydation chromique).

La graduation X est une graduation homographique, qui varie de o à l'infini.

Pour l'oxydation chromique il sera nécessaire d'établir une abaque telle que :

n varie de o à 40
N varie de 40 à 50
X varie de o à 1.

Il faudra d'autre part que les longueurs soient telles que les pointages puissent être précis.

Une abaque ainsi établie nous donnerait la valeur de X, on en déduirait, par soustraction, la valeur de Y.

Et l'établissement d'une deuxième abaque :

$$\frac{D}{T} = Y$$

nous donnerait le degré.

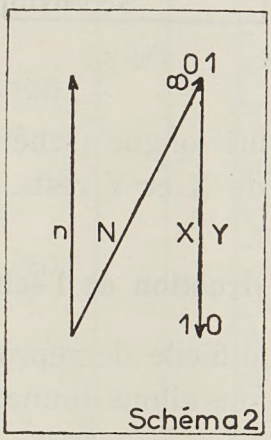


Fig. 2.

Il est possible de simplifier encore en supprimant la soustraction : au lieu de lire X sur une échelle homographique comme sur le schéma 1 on peut le placer sur une échelle arithmétique (schéma 2).

On peut établir l'abaque de telle sorte que X varie dans les limites indiquées (o à 1), sens positif descendant.

Si pour établir le deuxième abaque :

$$\frac{D}{T} = Y$$

on prend Y sur la même droite que X, en conservant la même échelle mais en intervertissant le sens positif (ascendant) on aura automatiquement effectué la soustraction.

Une seconde abaque en N partant de Y résoudra la 2e équation et donnera la degré.

Si l'on considère l'échelle de N, on constate que sur l'abaque les

valeurs de N pourront varier de 0 à l'infini. Or, les valeurs qui nous intéressent sont celles comprises entre 40 et 50.

Sur notre échelle la partie utile sera donc trop courte pour avoir un pointage précis.

On augmente la précision en adoptant des sens identiques pour des échelles *n* et X. La droite portant N passera par les deux origines et la

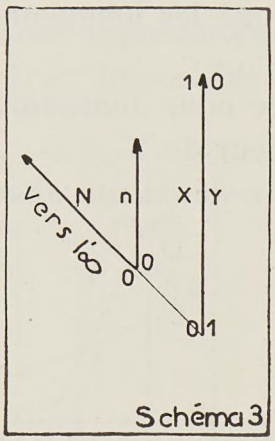


Fig. 3.

partie 0-α sera beaucoup plus longue (schéma 3). Bien entendu ce que nous avons établi à propos de X et Y reste entièrement valable.

Construction de l'échelle.

Étant donné qu'il est difficile de reproduire un tel type d'abaque par les procédés classiques, nous allons donner les éléments qui permettent d'en construire un.

Nous en avons représenté un modèle (fig. 4) à une échelle réduite.

Si l'on a :

échelle *n* 0,1 ml de sulfate ferreux égale 1 mm ;

échelle N module égal ou supérieur à celui de l'échelle *n* ;

échelle D° 1/10° de degré égale 2 mm ;

échelle T 0,1 égal ou est supérieur à 1 mm.

Les pointages pouvant s'effectuer à 1/2 mm, on pourra mesurer le sulfate ferreux à 1/20e de ml, c'est-à-dire à une goutte et avoir une précision de lecture de 0,02 pour le degré.

On trace tout d'abord l'axe central X, on lui donnera une longueur de 60 cm.

A gauche on trace parallèlement l'axe des *n* (longueur 40 cm pour 20 cm^{3}).

La droite qui joint l'origine de ces deux axes portera l'échelle N. Donc en rapprochant plus ou moins l'axe *n* de l'axe central, et en le plaçant plus haut que celui-ci on règlera la position de l'axe portant l'échelle N.

Pour graduer n il s'agit d'une échelle arithmétique classique.

Pour graduer N il s'agit d'une échelle homographique, elle sera obtenue avec facilité par projection de l'échelle n sur l'axe portant N à partir d'un point quelconque.

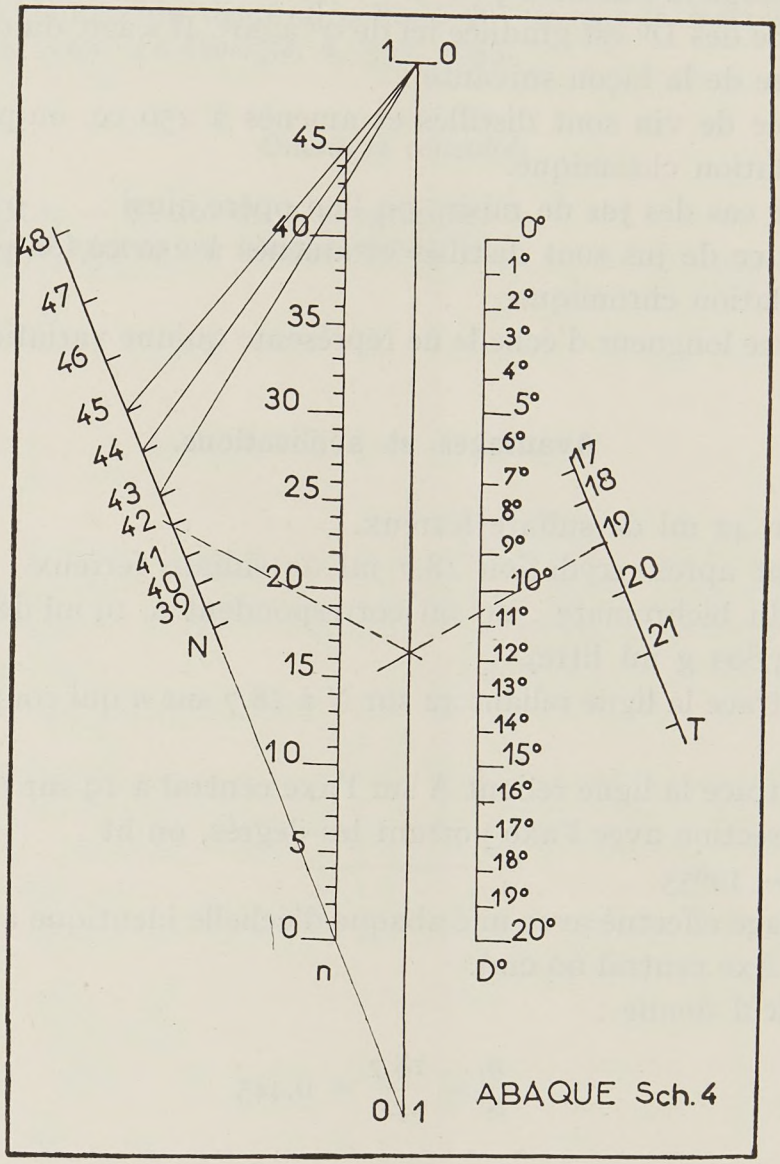


Fig. 4.

Pour simplifier, on aura intérêt à prendre le point 1 de l'axe central comme axe de projection. Nous avons représenté sur la figure 4 le mode d'obtention des points 43-44 et 45.

On notera que la précision de l'échelle N est toujours supérieure à celle de l'échelle n.

En observant les mêmes principes, et en tenant compte du changement de sens de l'axe central on construira l'abaque de droite.

L'encombrement maximum de l'abaque sera de 60 cm × 30 cm.

Remarque.

Il est bien évident que l'on pourra adopter d'autres graduations pour les échelles.

Par exemple, l'échelle T pourra être graduée en poids de bichromate.

L'échelle des D° est graduée ici de 0° à 20°. Il s'agit du cas des vins, où l'on opère de la façon suivante :

— 25 cc de vin sont distillés et amenés à 250 cc, on prélève 10 cc pour l'oxydation chromique.

Dans le cas des jus de raisin, où l'on opère ainsi :

— 125 cc de jus sont distillés et amenés à 250 cc, on prélève 10 cc pour l'oxydation chromique.

La même longueur d'échelle ne représente qu'une variation de 0 à 4°.

Avantages et applications.

Témoin 42 ml de sulfate ferreux.

Distillat après oxydation 18,7 ml de sulfate ferreux.

Titre du bichromate : 20 ml correspondent à 19 ml de bichromate exact (à 33,805 g ml litre).

1° On trace la ligne reliant 42 sur N à 18,7 sur *n* qui coupe l'axe central en A.

2° On trace la ligne reliant A sur l'axe central à 19 sur l'axe portant T, à l'intersection avec l'axe portant les degrés, on lit :

D° —— 10°55

(Pointage effectué avec une abaque d'échelle identique à celle décrite plus haut. Axe central 60 cm).

Le calcul donne :

$$\frac{n}{N} = \frac{18,7}{42} = 0,445$$

$$1 - \frac{n}{N} = 0,555$$

$$D° = 19 \times 0,555$$

$$D° = 10°54$$

La précision est donc satisfaisante. Le principal avantage d'un tel type d'abaque réside évidemment dans la rapidité d'obtention du résultat.

Reçu pour publication le 7 février 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SEMICHON (L.) et FLANZY (M.). — Dosage de l'alcool dans les vins et spiritueux par l'emploi du mélange sulfochromique. *Ann. Fals. Fraudes*, **22**, 139 et 414, 1929, **23**, 247, 1930.

(2) FLANZY (M.), BOUZIGUES (Mme L.) et BOUZIGUES (H.). — La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technologie*, **4**, 397, 1955.

Ouvrages consultés

D'OCAGNE (M.). — Traité de Nomographie.
GIET (A.). — Abaques ou nonogrammes.

CHRONIQUE DES LIVRES

TECHNIQUES MODERNES DE VINIFICATION

PAR

E. BRÈMOND
Professeur d'Œnologie à l'École Nationale d'Agriculture
de Maison-Carrée, Alger.

Dans la collection « Techniques Agricoles Méditerranéennes », E. BREMOND présente un précis d'Œnotechnique appliquée aux régions viticoles à climat chaud.

Après un avant-propos, historique rapide de la préparation du vin depuis le temps où nos ancêtres écrasaient le raisin et se contentaient, pour le reste, de laisser faire la nature, jusqu'à notre époque de moderne machinisme, il passe en revue les différentes périodes de la vie du raisin et étudie la constitution physico-chimique de la baie à maturité.

Il note ensuite les différentes espèces de levures, leur reproduction, leur nutrition, les diastases qu'elles sécrètent, l'influence des agents physiques et chimiques sur leur développement, puis rappelle les notions indispensables sur la fermentation alcoolique et fait le bilan de cette fermentation.

Il décrit l'implantation et l'aménagement rationnel de la cave, les récipients vinaires (cuves en bois, en ciment — leur affranchissement, les enduits protecteurs, l'entretien — cuves métalliques), puis, du vignoble à la cave, suit le raisin et le vin avant et pendant la fermentation ; il indique également les procédés modernes de fermentation dirigée.

Après une troisième partie consacrée à l'étude des mistelles, vins de liqueur, moûts mutés à l'anhydride sulfureux, il envisage, dans une quatrième partie la préparation des moûts concentrés de raisin et des jus de raisin.

Une cinquième partie rappelle quelques notions d'œnologie analytique, indique les techniques courantes d'analyse des moûts et des vins. Puis il traite des soins à donner aux vins, de leurs maladies, de leurs défauts, des accidents d'origine chimique ou physiologique.

Une huitième et dernière partie traite enfin des sous-produits de la vigne.

Dans cet ouvrage, de moins de 300 pages, de lecture agréable par sa forme et sa présentation, E. BREMOND réussit le tour de force de traiter avec ordre, méthode, clarté et élégance, tous les problèmes qui intéressent l'œnologue et le viticulteur. Débutant et scientifique y trouveront, sous une forme concise et pratique, de nombreux renseignements d'œnotechnique élémentaire.

Michel FLANZY.

Editeur : La Maison Rustique.

LE CALCIUM ET LE MAGNÉSIUM DANS LES POMMES ET LES POIRES ET DANS LES PRODUITS CIDRICOLES

PAR

P. JACQUIN [1]

Station de Recherches cidricoles, Rennes.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

Le calcium en cidrerie.
Le magnésium.

II. — Méthodes analytiques utilisées.

Préparation de l'échantillon.
Réactifs nécessaires.
Technique opératoire.

III. — Résultats analytiques.

Pommes de table et poires à poiré du verger de l'E. N. A.
Pommes à cidre.
Cidres industriels.
Cidres d'étude de variétés séparées.
Jus de pommes pasteurisés et Jus de pommes concentrés.
Bières.

IV. — Interprétation technologique.

V. — Conclusions.

VI. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

L'importance du calcium en cidrerie n'est plus à démontrer depuis que WARCOLLIER (1) basa la fabrication rationnelle du cidre sur la défécation naturelle du moût de pommes opérée à froid et aidée éventuelle-

[1] Travail effectué avec la collaboration technique de Mme Cherel.

ment par l'addition de sels défécants (sels de chaux de préférence). Cette opération assure grâce à la coagulation des matières pectiques l'élimination d'une grande partie des matières azotées, ce qui permet d'obtenir un milieu carencé en azote, condition primordiale à l'élaboration d'un cidre se conservant naturellement doux.

Les conditions à réunir pour réaliser, avec le maximum de réussite, cette opération essentielle en cidrerie, que l'on nomme, depuis WARCOLLIER, la défécation, nous sont maintenant bien connues et ont déjà été mentionnées dans plusieurs de nos publications antérieures (2). En effet depuis que FREMY (3) a rendu compte de ses premiers travaux sur la pectase, diastase végétale provoquant la coagulation de la pectine des fruits, ce qu'il nommait alors « fermentation pectique », BERTRAND et MALLEVRE (4) approfondirent le processus de ce phénomène et constatèrent que si la pectase était nécessaire, la présence de sels de chaux solubles était indispensable pour assurer cette coagulation pectique, mais que d'autres métaux alcalino-terreux, baryum et strontium pouvaient être substitués au calcium. Ils résument ainsi les premiers résultats de leurs recherches sur la pectase et établissent :

1° Que ce ferment ne peut, à lui seul, coaguler la pectine.

2° Qu'il ne provoque cette transformation qu'en présence d'un sel soluble de calcium, de baryum ou de strontium.

3° Car, en effet, le précipité formé dans ces conditions n'est pas, comme on l'avait cru jusqu'à présent de l'acide pectique, mais un pectate alcalino-terreux.

...« Quant à la magnésie, les résultats ont été beaucoup moins nets et tendent à faire supposer que ce corps n'intervient pas dans la fermentation pectique. En tout cas, on peut affirmer que son action est beaucoup plus faible que celle des bases alcalino-terreuses. »

Le calcium en cidrerie.

Tirant une première application pratique de ces recherches, LOUISE et SAUVAGE (5) observent en 1901 que l'addition de phosphate bicalcique au moût de pommes favorise la coagulation des matières pectiques. Ils recommandent donc l'utilisation de ce sel en cidrerie.

Puis dans de nombreuses publications, condensées dans son livre sur la cidrerie, WARCOLLIER (1) rend compte de ses nombreux travaux poursuivis à partir de 1905 sur cette question. Il signale en 1905 qu'en plus des alcalino-terreux les sels d'alumine exercent une action favorisante sur la défécation des moûts de pommes. En 1906 et 1907, cet auteur compare entre eux les différents sels défécants de chaux et d'alumine susceptibles d'être utilisés en cidrerie. Il préconise l'emploi d'un sel de chaux soluble, le sucrate de chaux de préférence au phosphate bicalcique dans la fabrica-

tion des cidres doux, mais en évitant de dépasser une dose de CaO supérieure à 300-400 mg par litre afin d'éviter des altérations de goût et une neutralisation trop importante de l'acidité naturelle du moût. Il reproche au chlorure de calcium d'apporter au moût l'ion Cl qui modifie désavantageusement la composition des cidres. Cependant, en 1913, WARCOLLIER admet l'emploi limité du sel marin associé à un sel de chaux bon défécant dans les cas où la défécation spontanée des jus de pommes est difficile à obtenir.

Enfin, en 1921, WARCOLLIER conseille l'addition du sel défécant, sucrate ou carbonate de chaux dans la pulpe pendant le cuvage à l'abri de l'air, ce qui assure une défécation plus rapide et plus complète. Il donne toujours sa préférence au sucrate à cause de sa solubilité, quitte à compenser ensuite la chute d'acidité qu'il occasionne, par l'addition d'acide tartrique.

Par la suite, la Station Pomologique de Caen conseille comme défécant un mélange de carbonate de calcium et de chlorure de sodium, ce dernier devant favoriser la rétraction du coagulum. Les sels défécants commerciaux s'inspiraient de cette composition complétée parfois par un peu de tanin catéchique.

Enfin, en 1951, se référant aux résultats obtenus à la Station, les années précédentes, sur la défécation des moûts par les différents sels de calcium, TAVERNIER (6) proposa aux industriels l'emploi du chlorure de calcium en solution à 35 p. 100, à raison de 100 ml par hectolitre. Ce sel rassemble tous les avantages de chacune des formules mises en compétition, sans en offrir les inconvénients, il est en effet entièrement soluble, ne diminue pas l'acidité, apporte à la fois l'ion Ca favorisant la coagulation et l'ion Cl favorisant la rétraction du coagulum, et garde un titre en chaux constant, alors que l'on peut reprocher :

— au phosphate bicalcique et au carbonate de chaux de ne jamais se dissoudre complètement,

— au carbonate et au sucrate de chaux d'abaisser l'acidité des moûts,

— au sucrate de n'avoir jamais un titre en chaux stable.

Le calcium étant donc reconnu comme nécessaire en cidrerie, puisque les spécialistes recommandent l'apport de sels de chaux aux moûts, il était normal de se renseigner sur la teneur des fruits de pressoir en chaux.

Dans son traité de cidrerie, WARCOLLIER signale la présence de chaux, de magnésie, d'alumine, etc. dans les matières minérales de la pomme et du moût sans préciser de doses, mais en attirant l'attention sur le calcium et l'alumine du fait de leur action sur la coagulation des matières pectiques.

Opérant sur des variétés de pommes de table, plusieurs auteurs de langue anglaise (7) donnent des doses de calcium variant de 56 à 95 mg par kg de substance fraîche, quantités variables suivant les variétés expérimentées et l'époque du prélèvement. BROWN (7) expérimente l'influence

du porte-greffe et de l'année sur une variété de pomme de table Lane's Prince Albert ainsi que l'influence du sol sur Bramley Seedling sans trouver de grandes différences dans la teneur en CaO des fruits, le facteur de variation le plus important étant la variété.

Enfin en 1945, Mlle Bejambes et Tavernier (8) publièrent les résultats de dosages de chaux effectués d'une part sur le jus d'une vingtaine de variétés de pommes à cidre provenant d'un même verger, donc du même sol, et d'autre part sur une douzaine de variétés provenant de terrains de constitution géologique différente. De ce travail, on peut conclure :

1° Pour les variétés cultivées sur le même sol, que la teneur en chaux est en général proportionnelle à l'acidité du jus.

2° Pour les échantillons provenant de terrains différents, que la teneur en calcium du jus dépend plus de la variété que de la formation géologique du terrain et de la teneur en chaux du sol considéré. Des variétés cultivées sur sol non calcaire sont aussi riches en chaux que d'autres récoltées sur sol calcaire. Mais pour une même variété, la teneur du sol en CaO se réflète dans la composition du jus en cet élément.

Les teneurs trouvées par ces auteurs dans le jus des pommes à cidre étudiées et provenant du même verger varient de 36 mg à 135 mg de CaO par litre de jus pour les pommes douces et de 64 à 308 mg de CaO par litre pour les pommes aigres (acidité 4,60 à 13,13 exprimée en g SO_4H_2 par litre). A noter que le sol de ce verger présente une réaction pH : 7,2 et ne renferme que des traces indosables de CO_3Ca.

Ayant établi que les pommes à cidre douces et douces-amères sont relativement pauvres en calcium, ces auteurs recommandent l'apport de sels de chaux en cidrerie, afin de faciliter l'action de la pectase.

Le magnésium.

Nous avons déjà vu que, d'après les travaux de Bertrand et Mallevre, la magnésie ne semble pas intervenir directement dans la coagulation pectique et en tout cas que son action est beaucoup plus faible que celle des bases alcalino-terreuses : chaux, baryte, strontium.

On peut donc dire que la teneur des fruits de pressoir en magnésie n'a pas d'importance particulière en cidrerie et que du point de vue technologique strict, on pourrait négliger l'étude de ce métal.

Toutefois, certains nutritionnistes et physiologistes ont été conduits à consacrer la plus grande partie de leurs travaux à la mise en valeur de l'intérêt nutritionnel d'éléments dont l'importance leur semblait méconnue, « tel est le cas pour le magnésium dont l'importance en nutrition fait l'objet de discussion dont l'avenir dira les conclusions qu'il convient d'en tirer » (9).

Le magnésium est, comme le calcium, un élément minéral abondant,

plastique du corps humain. Tous deux contribuent à la formation du squelette. Le corps d'un homme adulte renfermerait environ 1 kg de calcium, pour 30 g de magnésium.Et une ration normale apporte quotidiennement de 15 à 25 g de matières minérales dont 0,6 à 1 g de Ca et 0,3 à 0,4 g de Mg (CAUSERET).

Le magnésium est un élément essentiel de la vie puisque sa présence est strictement indispensable aux végétaux. L'expérience classique de RAULIN a montré l'efficacité de Mg, sans lui il n'y a pas de construction de matière vivante. Le magnésium entre pour une faible quantité dans la constitution de la chlorophylle (2,7 p. 100 de Mg) d'après DEMOLON (10). Plus mobile que le calcium il semble constituer le véhicule d'une partie du phosphore. Il est également indispensable à la formation des matières grasses (REED, cité par DEMOLON). D'après JAVILLIER (11), il participe au métabolisme hydrocarboné, lipoïdique, azoté ; il est lié à la sucrase d'où dépendent la synthèse et l'hydrolyse du saccharose ; il sensibilise les catalyseurs organiques qui dégradent les sucres, il active la carboxylase et certaines phosphatases et peptidases.

En agronomie, son importance a été reconnue dès LIEBIG. Cependant le temps n'est pas si loin où l'on doutait encore de l'importance de la magnésie en tant qu'élément nutritif des plantes. Mais des carences magnésiennes ont été constatées sur céréales, coton, sorgho, par des agronomes américains. Sa déficience entraîne des chloroses sur avoine d'après BLATTNY, cité par DEMOLON. Bien qu'en France, les sols soient généralement bien pourvus en magnésie, ce qui évite des carences marquées, il peut cependant s'en produire d'atténuées, nuisibles à la production végétale et par répercussion à la santé publique. C'est ainsi que TROCME (12) a décelé des symptômes de carence magnésienne sur pommiers dans différents vergers de la région parisienne et de l'Orléanais. Le pommier se révèle être ainsi une plante sensible au magnésium. Les symptômes de carence sont d'intensité variable suivant les années et la déficience en magnésium serait particulièrement exaltée par un excès de potasse. Les arboriculteurs doivent donc dès maintenant s'inquiéter des moyens de traitement ou mieux de prévention de cette maladie de carence.

J. LAVOLLAY (13) a montré les incidences des carences en Mg sur l'état physiologique des animaux. Il résulte de ses travaux que le magnésium est un élément essentiel strictement indispensable, et dont l'absence dans la ration alimentaire provoque assez rapidement la mort des animaux en expérience. Des nombreux travaux effectués par différents auteurs pour élucider l'action spécifique du magnésium sur le développement osseux, et que nous ne pouvons citer ici, les conclusions sont assez contradictoires : tantôt l'ingestion de magnésium favoriserait la rétention du calcium dans l'organisme et aurait une action nettement

antirachitique ; tantôt le magnésium exercerait une action défavorable sur la formation des os des animaux mis en expérience.

Mme RANDOIN et CAUSERET entreprirent alors sur des rats blancs des séries d'expériences afin d'élucider ces contradictions. Ils arrivent ainsi à conclure que les effets du magnésium sur le développement osseux sont différents selon l'équilibre de la ration en calcium, en phosphore, et en vitamine D. Le magnésium, qui agit comme un régulateur de la fixation du Ca dans l'organisme, doit faire partie intégrante du complexe « Ca-P-Vit. D ». Ces auteurs trouvent ainsi que pour les rats, le meilleur résultat est obtenu avec des rations contenant Ca, P, et Mg dans les rapports : Ca/P = 1 et Ca/Mg = 4. Un équilibre convenable est donc nécessaire entre les teneurs en Ca et en Mg du régime alimentaire.

D'après toutes les expériences réalisées tant dans le règne végétal que dans le règne animal, on peut donc énoncer que le magnésium joue un rôle important dans tout le monde vivant.

Il en est certainement de l'homme comme de toutes les espèces animales et JAVILLIER chiffre pour l'homme adulte le besoin en magnésie à 250 mg par jour. Il indique également que le magnésium, outre son rôle physiologique certain, peut exercer dans certains cas un rôle thérapeutique, une activité « cytophylactique » selon le professeur DELBET qui admet également l'existence de relations entre la richesse des sols et des plantes en magnésium et la fréquence des cas de cancer. D'après le Dr NEVEU, également cité par JAVILLIER « la minéralisation magnésienne guérit la fièvre aphteuse, l'avortement épizootique, la gourme des chevaux, le rouget du porc, la diphtérie et le choléra aviaire, la coccidiose des lapins ». Il ne nous appartient pas d'insister sur ce dernier aspect de la question, qui n'est pas de notre ressort, nous abandonnerons donc la notion de « magnésium médicament » pour nous cantonner à celle de « magnésium aliment ». En nous référant au chiffre de JAVILLIER, une alimentation rationnelle doit donc apporter quotidiennement à l'homme adulte une dose de magnésium de l'ordre de 250 mg, dose qui doit d'ailleurs être largement augmentée lorsque le régime est particulièrement riche en hydrates de carbones, la valeur du rapport Mg/glucides ayant une grande importance dans la chimie nutritionnelle ainsi que l'a excellemment montré LAVOLLAY.

Nous avons donc pensé apporter une modeste contribution personnelle aux nutritionnistes et aux physiologistes en leur indiquant les doses de magnésium susceptibles d'être apportées dans la ration quotidienne par les pommes, les poires et les boissons qui en dérivent. Sachant d'après le professeur DELBET (15) que la magnésie pouvait varier dans d'assez grandes limites dans les végétaux (de 0,060 à 0,429 p. 100 dans les épinards), nous avons voulu rechercher quelles fluctuations pouvaient être observées pour cet élément dans les fruits des pomacées. Jusqu'ici, peu

d'auteurs, à notre connaissance s'étaient occupés de cette question ou ne donnaient que des chiffres moyens. Ainsi SHERMAN (16) indique dans son ouvrage : 0,006 p. 100 de Mg dans la pomme. BROWN (7) donne des teneurs variant de 0,0058 à 0,0071 p. 100 de matière fraîche (exprimé en MgO) pour la pomme Lane's Prince Albert, et 0,037 à 0,0050 p. 100 de MgO pour la pomme Bramley Seedling cultivée sur sols différents. LAVOLLAY, PATRON S. et PATRON A.(17) citent les chiffres moyens de 5 mg pour la pomme et 7 mg pour la poire en Mg pour 100 g de fruit frais.

Ces quelques données concordent assez bien, mais il nous manquait une étude systématique des teneurs possibles de ce métal dans les pommes; nous avons voulu remédier à cette lacune et aussi vérifier si le magnésium intervenait dans la coagulation des matières pectiques.

II. — MÉTHODES ANALYTIQUES

Dans leur étude sur le calcium dans les pommes à cidre, BEJAMBES et TAVERNIER avaient dosé cet élément dans le jus après minéralisation, par la méthode classique à l'oxalate, le précipité d'oxalate de calcium étant repris, après calcination, par SO_4H_2 et pesé à l'état de sulfate de chaux.

Cette technique classique et excellente, ne nous a pas paru convenable pour des analyses en grande série, dans lesquelles nous avions à doser également la magnésie. C'est pourquoi nous avons utilisé la méthode complexométrique au versénate de sodium. Les méthodes de dosage au moyen de complexon ont été décrites par SCHWARZENBACH (18) et ses collaborateurs dans de nombreuses publications, elles ont été également utilisées fréquemment par de nombreux chercheurs (19) pour les analyses d'eaux, de liquides biologiques, etc. ; nous ne pouvons en faire ici une bibliographie complète et ne citerons que les principaux d'entre eux.

Nous nous sommes inspirés dans notre travail de la technique mise au point par Mlle MAZOYER (20) pour le dosage du calcium et du magnésium échangeables dans les extraits de sol.

Préparation de l'échantillon.

1° Dessiccation.

Pour le dosage de Ca et Mg dans les liquides, 50 cc exactement mesurés à la pipette sont introduits dans une capsule de platine. L'échantillon ainsi prélevé est tout d'abord évaporé à l'état sirupeux au bain-marie, puis desséché à l'étuve à 200°. Pour les analyses de fruits, ceux-ci sont passés à la râpe, la râpure bien homogénéisée, on en prélève un poids exactement connu voisin de 50 g dans une capsule de platine, puis on

dessèche cette pulpe à l'étuve en montant progressivement la température de 100° à 200°.

2° Calcination.

On incinère alors avec précaution et en chauffant modérément sans dépasser le rouge sombre. Puis on reprend les cendres encore grises ou noirâtres à l'eau chaude bidistillée dans le verre, afin de séparer les cendres solubles (chlorures et carbonates) par lessivage et filtration. On calcine la partie charbonneuse restant dans la capsule et sur le filtre, on additionne la capsule des cendres solubles et de 2 cc d'HCl, puis on laisse digérer à chaud 30 minutes et amène le tout à 50 cc dans une fiole jaugée.

Réactifs nécessaires.

Ils sont préparés avec de l'eau bidistillée dans le verre afin d'éviter l'apport d'ions étrangers.

a) *Dosage du calcium* :

— Solution de NaOH N/1.

— Solution de NaOH 2,5 N environ.

— Solution étalon de Ca : préparée par dissolution de 2,497 g de carbonate de calcium pur et sec dans 5 cc d'acide chlorhydrique puis amené à 1 000 cc avec eau bidistillée. 1 cc = 1 mg de Ca.

— Solution de Versénate N/50 : préparée par dissolution de 3,721 g de versénate dans 1 000 cc d'eau bidistillée, puis titrée exactement à l'aide de la solution étalon de Ca ci-dessus.

— Cyanure de Potassium à 1 p. 1000.

— Poudre d'indicateur : obtenue par mélange de 0,2 g de murexide (sel d'ammonium de l'acide purpurique) dans 40 g de sulfate de potassium pur pulvérisé (le murexide en solution aqueuse ne se conserve pas).

— Citrate de sodium pur pulvérisé.

b) *Dosage du magnésium* :

— Solution de NaOH N/1.

— Solution tampon ammoniacale (pH = 10) : obtenue par dissolution de 67,5 g de NH_4Cl dans l'eau bidistillée. On ajoute 570 cc d'ammoniaque concentrée pur. On amène à 1 l avec de l'eau bidistillée.

— Solution étalon de Mg : dissoudre 1,014 g de SO_4 Mg, 7 H_2O pur dans 1 000 cc d'eau distillée. 1 cc = 0,1 mg de Mg.

— Solution de Versénate N/50.

— Indicateur : obtenu par dissolution de 0,2 g de Noir d'Eriochrome T et de 2 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 50 cc de méthanol pur. L'addition de chlorhydrate d'hydroxylamine est faite dans le but d'éviter l'oxydation du colorant, qui est très oxydable et irréversible en milieu alcalin.

Cette solution relativement stable ne doit pas être gardée plus de 2-3 semaines. On peut également utiliser cet indicateur en mélange solide à 1 p. 100 dans le chlorure de Na pulvérisé par exemple.

— Solution de KCN à 1 p. 1 000.

Technique opératoire.

a) Dosage du calcium :

On opère au préalable le dosage de l'acidité de la liqueur obtenue après minéralisation, en présence d'une goutte de phénolphtaléine, avec la liqueur normale de NaOH. Puis on prélève généralement 10 cc de cette liqueur originelle. Pour respecter les conditions d'emploi du versénate, il faut que la prise d'essai contienne entre 1 et 2 mg de Ca. La prise d'essai à doser est tout d'abord additionnée d'une pincée de citrate de sodium afin d'éviter toute précipitation d'hydroxyde de Ca en milieu alcalin. Puis on ajoute 2 cc. de KCN pour bloquer les métaux lourds, une pincée de poudre de murexide diluée, et 2 cc de NaOH 2,5 N afin d'imposer au mélange un pH de 12.0, zone où le complexe Ca-Murexide est stable.

On titre alors lentement au versénate N/50 en faisant arriver celui-ci goutte à goutte. Placer le bécher sur fond blanc, et opérer en bonne lumière diffuse. La coloration vire du rouge au violet lorsque tout le Ca est complexé. Pour plus de précision, on arrête l'affusion de versénate dès que la goutte qui tombe ne vire plus au bleu. Ce point de virage est assez délicat à saisir, mais après quelques dosages d'entraînement, on obtient des résultats très corrects, 1 cc de versénate N/50 correspondant à 0,400 mg de Ca, on calcule la teneur pour l'échantillon analysé, en rapportant soit au litre, soit au kg.

b) Dosage du magnésium

Principe :

Celui-ci se fait par différence. D'après Schwarzenbach, la stabilité du versénate de Ca est plus grande que celle du Mg ; l'on peut donc doser le Mg avec le Ca, en présence de noir d'ériochrome. Le versénate complexe tout d'abord les ions Ca libres, puis les ions Mg libres et enfin les ions Mg complexés par le noir d'ériochrome. On obtient alors un volume de versénate correspondant à la somme Ca + Mg. On retranche de ce chiffre, le volume de versénate combiné au Ca trouvé dans le dosage précédent, et la différence donne la quantité de versénate correspondant au Mg.

Technique :

On neutralise à la soude N/1, 10 cc de la liqueur originelle. On y ajoute : 2 cc de cyanure de potassium ; VI gouttes de noir d'ériochrome, puis 2 cc du tampon ammoniacal.

On titre alors lentement sur fond blanc, jusqu'à ce que la coloration rouge vire au bleu, indice de complexion complète du Mg.

1 cc de versénate N/50 correspondant à 0,243 mg de Mg, on multiplie la différence obtenue entre le volume de versénate consommé dans ce dosage et le dosage du Ca par ce facteur et on rapporte comme précédemment au litre ou au kg de matière analysée.

Nota :

Lorsque la liqueur est relativement riche en Ca + Mg, on opère ce dernier dosage sur 5 cc au lieu de 10 cc. Il convient alors de doubler le volume de versénate consommé avant d'en retrancher le volume utilisé dans le dosage du Ca seul.

La méthode au versénate ainsi décrite est d'une fidélité très satisfaisante lorsque l'on est bien entraîné aux virages, en particulier à celui du murexide dans le dosage du calcium. Il faut cependant faire remarquer que, le dosage du magnésium étant effectué par différence, l'erreur que l'on peut commettre dans le dosage du Ca se répercute sur le dosage du Mg. Après de nombreux essais, nous pouvons estimer que l'erreur moyenne peut se fixer entre 1 et 2 p. 100 pour le Ca et 2 à 5 p.100 pour le Mg. C'est donc une méthode suffisamment précise pour les analyses en série.

III. — RÉSULTATS ANALYTIQUES

Nous avons appliqué cette méthode aux déterminations de Ca et Mg :

— dans la pulpe et le jus de 15 variétés de pommes de table provenant d'un verger de collection de l'E. N. A. ;

— dans la pulpe et le jus de 12 variétés de poires à poiré provenant également du verger de collection de fruits à cidre de l'E. N. A. ;

— dans la pulpe et le jus de 20 variétés de pommes à cidre d'origines diverses ;

— dans 55 échantillons de cidres industriels provenant des principales cidreries de la région de l'Ouest et un cidre belge ;

— dans 114 échantillons de cidres pur jus de variétés séparées brassés à notre Station ;

— dans 6 échantillons de jus de pommes industriels et dans 14 échantillons de jus de pommes concentrés industriels à 38° Bé.;

— dans 10 échantillons de bière provenant de différentes brasseries de l'Ouest (pour comparaison avec les cidres).

1° Pommes de table et Poires à poiré du verger de l'E. N. A.

Les analyses de pommes et poires provenant des vergers de l'E. N. A. ont été effectuées sur des fruits cueillis par nous à l'époque de maturité. Ces fruits ont été bien lavés à l'acide chlorhydrique dilué, puis à l'eau

distillée afin de les débarrasser des traces de pesticides qui pourraient encore les souiller.

L'analyse de la pulpe a été effectuée sur de fines tranches prélevées sur les fruits à l'aide d'un couteau inoxydable. Nous avons ainsi prélevé un segment sur un nombre de fruits variant de 10 à 25 selon la taille, de façon à obtenir un poids total compris entre 50 et 55 g, pesé exactement dans une capsule de platine, ce qui nous assurait un bon échantillon moyen.

Après ce prélèvement, les fruits étaient alors passés à la râpe mécanique, puis à la presse de laboratoire afin d'en extraire le jus, dont on prélevait 50 cc mesurés à la pipette, et introduits dans une capsule de platine. Les analyses étaient alors opérées ainsi qu'il a été expliqué précédemment.

Les tableaux suivants I et II rassemblent les résultats obtenus d'une part sur les pommes de table, d'autre part sur les poires à poiré du verger de l'E. N. A. Ils mentionnent pour chaque variété : la densité du jus, ainsi que son acidité exprimée en g SO_4H_2 par litre, la teneur de la pulpe en Ca et Mg (en mg par kg), la teneur du jus de pression en Ca et Mg (en mg par litre), le rapport Ca/Mg dans la pulpe et le jus de pression.

Nous avons également effectué une analyse succincte de la terre de ce verger, les résultats en sont les suivants, exprimés en g pour 1 000 de terre fine et sèche :

Chaux soluble aux acides forts en CaO.....	3,236 p. 1 000
Magnésie soluble aux acides forts en MgO	4,812
Chaux échangeable à l'acétate d'ammonium, en CaO ...	2,643
Magnésie échangeable à l'acétate d'ammonium, en MgO	0,181
Réaction pH	7,15

D'après les résultats trouvés par BASTISSE et DEMOLON (signalé par JAVILLIER) sur trente sols français, la magnésie soluble dans les acides forts varie de 1,180 à 22,960 g par kg de terre, moyenne 4,830 g. La magnésie échangeable varie de 0,054 à 1,046 g par kg de terre avec une moyenne de 0,277 g.

Cette terre peut donc être considérée comme suffisamment pourvue en chaux et en magnésie échangeable, et les arbres qui y croissent d'ailleurs sans présenter aucun symptôme de carence peuvent être tenus comme normalement approvisionnés en ces deux éléments. Les résultats consignés dans les tableaux I et II peuvent donc être retenus comme pleinement valables, puisque se rapportant à des fruits cultivés dans des conditions normales d'alimentation en chaux et en magnésie. Ces deux tableaux nous montrent donc que pour un sol donné, les teneurs en calcium varient dans de bien plus grandes limites que celles de magnésium, tant dans la pulpe que dans le jus de pommes. Cette constatation est valable aussi bien pour les poires que pour les pommes. Alors que la teneur en calcium peut aller du simple au quadruple dans la pulpe des pommes analysées, elle varie

du simple au quintuple dans le jus ; pour le magnésium les fluctuations sont respectivement du simple au double, et de 1 à 1,5. Pour les poires à poiré où l'acidité de titration s'échelonne comme pour les pommes de 2 à 7,5 g SO_4H_2 par litre, les variations maximum constatées sont moins importantes pour le calcium : du simple à 2,5 fois dans la pulpe et du simple au double dans le jus, tandis que pour le magnésium elles restent du même ordre : du simple au double dans la pulpe et de 1 à 1,75 fois dans le jus.

On peut donc tirer de ces faits une première conclusion, à savoir que le magnésium est beaucoup plus constant dans ces deux fruits, beaucoup moins sujet à de grandes fluctuations que le calcium. Cette conclusion est d'autant plus valable que toutes ces analyses ont été effectuées sur des fruits provenant du même verger. Le magnésium paraît donc nettement moins influencé que le calcium par la variété. La teneur des fruits de pomacées en calcium serait donc surtout un facteur variétal. Il est difficile, sinon impossible d'établir une relation entre l'acidité du fruit et sa teneur en alcalino-terreux. Il y a une vague influence de l'acidité sur la richesse en Ca et en Mg, les fruits les plus acides ayant tendance à présenter également les plus fortes teneurs en alcalino-terreux, mais il n'y a aucune règle, pas plus pour les pommes que pour les poires, ce qui tend à prouver que l'action neutralisante est surtout exercée par le potassium, qui est d'ailleurs le constituant le plus important des matières minérales de ces fruits.

2° Pommes à cidre.

Nous avons également effectué les dosages de Ca et de Mg sur vingt variétés de pommes à cidre provenant des 4 départements bretons et de la Manche et qui nous avaient été envoyées par lots d'une cinquantaine de kg afin d'en faire l'étude technologique.

Les dosages de Ca et de Mg ont été faits :

1° Sur la pulpe de chaque variété.

2° Sur le jus de pression de cette pulpe.

3° Sur le jus additionné de sel défécant (chlorure de calcium à la dose moyenne de 110 mg de calcium par litre de moût).

4° Sur le jus après défécation naturelle, et après défécation provoquée par l'addition de $CaCl_2$.

5° Sur les cidres après fermentation.

Ces expériences avaient pour but de nous renseigner sur l'évolution de ces deux éléments au cours des principales opérations cidricoles, et particulièrement de nous préciser l'influence de la défécation naturelle ou provoquée, sur l'élimination partielle du Ca et du Mg dans les moûts ; et enfin de nous permettre de fixer dans quelle proportion la fermentation pouvait être une cause supplémentaire d'appauvrissement des cidres en ces deux métaux.

Le tableau III rassemble les résultats des dosages du Ca et du Mg obtenus.

L'étude de ce tableau confirme tout d'abord les faits observés pour les pommes de table et pour les poires à poiré, à savoir :

1° Que le fruit entier renferme des teneurs en Ca très variables d'une variété à l'autre, puisque dans ce cas les extrêmes sont de 58,7 mg et 189,6 mg de Ca par kg de pulpe avec une moyenne de 114,6 mg.

2° Que les variations de richesse en Mg dans le fruit sont nettement moins importantes que pour Ca, elles oscillent pour les 20 variétés entre 60,6 mg et 100,3 mg avec une teneur moyenne de 76,7 mg par kg de pulpe.

3° Que le Mg est là aussi plus soluble que le Ca, il passe en plus grande proportion dans le jus de pression, puisque le rapport moyen Ca/Mg passe de 1,49 dans la pulpe à 1,16 dans le jus.

TABLEAU I

Pommes de table. Verger de l'E. N. A.

Variétés	Dans la pulpe en mg par kg			Dans le jus par litre				
	Ca	Mg	Rapport Ca/Mg	Densité à 15°C	Acidité g SO_4H_2	Ca en mg	Mg en mg	Rapport Ca/Mg
Boria	53,0	61,9	0,85	1 041,5	5,24	34,0	58,8	0,58
Brettacher	56,4	51,6	1,09	1 052,0	6,42	28,0	45,6	0,61
Canada d'Auvergne	65,3	68,6	0,95	1 064,0	7,55	34,0	58,8	0,58
Gano	85,9	80,9	1,06	1 050,0	3,33	48,0	50,4	0,95
Gewurluiken	57,2	63,5	0,90	1 047,0	4,85	28,0	49,2	0,57
Golden Delicious	110,0	74,2	1,48	1 064,5	3,53	42,0	48,0	0,87
Jonathan	92,4	60,6	1,52	1 057,0	5,30	52,0	48,0	1,08
King David	125,0	75,0	1,66	1 048,5	6,62	64,0	56,4	1,13
Reinette d'Armorique	91,1	49,5	1,84	1 047,0	4,95	42,0	48,0	0,87
Reinette de Caux	97,2	80,0	1,21	1 043,0	3,67	44,0	45,6	0,96
Reinette grise de Vitry	70,1	70,6	0,99	1 054,0	7,45	46,0	63,6	0,72
Reinette de Maurs (Cantal)	88,2	58,1	1,52	1 044,0	3,10	36,0	56,4	0,64
Reinette de Saintonge	232,0	94,5	2,45	1 044,0	6,27	96,0	74,4	1,29
Staymann Winesap	84,6	62,2	1,36	1 051,5	3,62	38,0	46,8	0,81
Starking Delicious (203)	54,2	73,4	0,74	1 056,0	2,08	18,0	46,8	0,38
Maximum	232	94,5	2,45	1 064,5	7,55	96,0	74,4	1,29
Minimum	53	49,5	0,74	1 041,5	2,08	18,0	45,6	0,38
Moyenne	90,8	68,3	1,33	1 050,9	4,93	43,3	53,2	0,81

Si l'on compare les tableaux I et III, on est amené à constater que malgré une acidité de titration très inférieure (moyenne 1,53 g SO_4H_2 par litre) les pommes à cidre sont généralement plus riches en alcalino-terreux que les pommes de table beaucoup plus acides (acidité moyenne 4,93 g SO_4H_2 par litre) les teneurs moyennes en Ca et Mg étant respectivement de 114,6 mg et 76,7 mg par kg de pulpe dans les fruits de pressoir pour 90,8 mg et 68,3 mg dans les fruits de table.

Il n'en va pas de même dans les jus de pression de ces fruits ; si l'on obtient encore une teneur en Ca un peu plus élevée pour les fruits de pres-

soir : 46,9 mg par litre contre 43,3 mg par litre pour les pommes de table, cette différence est presque négligeable et quant au magnésium, on observe un renversement de la situation, ce sont les jus de pression des fruits de table qui sont les mieux pourvus en moyenne : 53,2 mg par litre contre 40,5 mg par litre pour les fruits de pressoir. On peut donc conclure que Ca et Mg sont moins mobiles dans les fruits de pressoir que dans les fruits de table, cette différence de comportement pouvant trouver son explication dans la composition interne différente de ces catégories de fruits. Les fruits de pressoir sont généralement beaucoup plus riches en matières pectiques, et il est permis de supposer que les alcalino-terreux sont, au moins en partie, fixés sur ces constituants sous forme de pectates alcalino-terreux. Cette hypothèse est autorisée par les études in vitro de BERTRAND et MALLEVRE sur les pectines végétales, mais ce n'est qu'une hypothèse et d'autres combinaisons complexes chimiques ou physiques entre les alcalino-terreux et les autres constituants de la cellule du fruit peuvent être envisagées.

TABLEAU II

Poires à poiré. Verger de l'E. N. A.

Variétés	Dans la pulpe en mg par kg			Dans le jus par litre				
	Ca	Mg	Rapport Ca/Mg	Densité à 15°C	Acidité g SO_4H_2	Ca en mg	Mg en mg	Rapport Ca/Mg
Carisi	173,7	76,0	2,38	1 035,5	2,65	66,0	46,8	1,41
Coignet	186,9	122,7	1,52	1 065	7,75	84,0	82,8	1,01
Deniacre	117,7	91,4	1,28	1 058	4,75	44,0	67,2	0,65
Fausset	156,0	79,4	1,96	1 056	5,50	52,0	58,8	0,88
Graneville	142,7	94,5	1,51	1 070	6,07	56,0	67,2	0,83
Gros Blot	111,7	93,5	1,19	1 054,5	7,80	52,0	73,2	0,71
Muscadet	191,2	75,3	2,54	1 062,0	7,20	62,0	56,4	1,09
Navet	236,7	113,2	2,09	1 061,0	2,55	66,0	69,6	0,95
Petit Roux	136,0	147,5	0,92	1 066,0	3,18	48,0	73,2	0,65
Plant de Blanc	97,0	93,5	1,04	1 067,0	5,88	54,0	79,2	0,68
Rousset	147,7	85,3	1,73	1 051,0	5,78	58,0	66,0	0,88
Souris	134,7	98,4	1,37	1 052,5	2,90	44,0	68,4	0,64
Maximum	236,7	147,5	2,54	1 070	7,80	84,0	82,8	1,41
Minimum	97,0	75,3	0,92	1 035,5	2,55	44,0	46,8	0,64
Moyenne	152,6	97,5	1,56	1 058,2	5,17	57,2	67,4	0,85

INFLUENCE DE LA DÉFÉCATION

Reprenant l'étude du tableau III, on peut constater en général que la défécation provoque un abaissement de la richesse du jus en Ca et aussi en Mg. Cependant la chute de la teneur en Ca est plus nette, la richesse moyenne tombe de 46,9 mg par litre à 40,5 mg par litre pour Ca (perte moyenne : 13,6 p. 100) alors que pour Mg on passe de 40,5 mg par litre à 37 mg par litre dans les jus subissant une défécation naturelle. Nous

TABLEAU III. — *Pommes à cidre.*

Variétés	Pulpe			Jus de pression								Jus additionné de $CaCl_2$					Cidre fermenté				
	mg/kg		Ca/Mg	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	mg/litre		Ca/Mg	Après défécation naturelle			Avant défécation	Après défécation				Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	mg/litre		Ca/Mg
									mg/litre		Ca/Mg	mg/litre				Ca/Mg					
	Ca	Mg				Ca	Mg		Ca	Mg		Ca	Mg	Ca	Mg				Ca	Mg	
Manche :																					
Béda	118,5	78,0	1,52	1 051	2,00	60	52,8	1,13	non déféqué			170	51,6	160	51,6	3,10	1 002,5	1,81	152	38,9	3,90
Charge souvent	106,3	85,1	1,25	1 045	1,27	50	44,4	1,13	non déféqué			162	44,4	136	39,6	3,43	1 017,2	2,25	132	36,5	3,61
Cimetière	137,7	75,5	1,82	1 057	1,71	44	33,6	1,31	34	32,4	1,05	154	32,4	110	31,2	3,52	1 028,0	2,55	104	30,4	3,42
Cœur dur	77,9	72,7	1,07	1 047	1,22	24,0	43,2	0,55	non déféqué			134	43,2	122	27,6	4,42	1 023,5	2,80	116	24,3	4,77
Doux amer	81,9	68,3	1,19	1 050	1,86	52,0	46,8	1,11	48,0	40,8	1,18	160	46,8	146	44,4	3,28	999,5	3,04	144	44,2	3,25
Équerquille	77,2	60,6	1,27	1 045,5	1,02	28,0	24,0	1,16	non déféqué			130	24,0	122	22,8	5,35	1 014,7	2,30	80,0	19,4	4,12
Feuillard	102,1	61,3	1,66	1 046,5	1,76	58,0	42,0	1,38	48,0	40,8	1,18	166	42,0	142	39,6	3,58	1 019,5	3,28	140	38,8	3,61
Marin Onfroy	104,3	80,4	1,30	1 053	2,49	42,0	42,0	1,00	non déféqué			148	43,2	142	42,0	3,38	1 010,3	3,33	138	42,0	3,28
Taureau	155,9	63,5	2,45	1 050	2,25	50,0	48,0	1,04	50,0	45,6	1,10	156	48,0	150	42,0	3,57	1 000,5	2,40	148	42,0	3,52
Tête de brebis	58,7	66,9	0,88	1 056	1,56	36,0	30,0	1,20	28,0	26,4	1,06	124	30,0	96	31,2	3,07	1 031,0	3,04	96	29,1	3,30
Quatre bières amer	131,5	82,3	1,59	1 047	1,03	48,0	43,2	1,11	42,0	37,2	1,13	170	42,0	150	37,2	4,03	1 017,2	2,64	148	34,0	4,35
Quatre bières doux	97,6	86,2	1,13	1 050	1,37	38,0	40,8	0,93	26,0	37,2	0,70	164	40,8	138	36,0	3,83	1 019,2	2,13	136	36,0	3,77
Finistère :																					
Chuero Rous	140,6	87,9	1,60	1 055,5	1,32	46,0	43,2	1,19	46,0	43,2	1,06	144	43,2	144	43,2	3,33	1 014,5	1,91	142	41,3	3,43
Doux évêque Briz	189,6	75,2	2,52	1 063	1,22	66,0	42,0	1,57	50,0	40,8	1,22	200	42,0	170	39,6	4,29	1 017,7	2,74	164	40,1	4,09
Dous Rous Bihan	153,9	67,5	2,28	1 050,2	2,10	46,0	31,2	1,47	32,0	26,4	1,21	150	32,4	118	30,0	3,93	999,5	2,15	120	29,2	4,10
Ille-et-Vilaine :																					
Doux au lièvre	109,7	76,3	1,43	1 038	0,93	44,0	38,4	1,14	42,0	25,2	1,66	152	38,4	132	28,8	4,58	1 004,0	2,75	132	28,0	4,71
Doux au prince	92,6	93,8	0,98	1 044,5	2,00	50,0	43,2	1,15	40,0	43,2	0,92	162	43,2	106	43,2	2,45	1 015,7	2,55	104	38,9	2,67
Rouge	155,4	100,3	1,55	1 048,2	1,71	60,0	45,6	1,32	56,0	42,0	1,33	190	42,0	170	40,8	4,16	1 020,0	2,35	160	36,5	4,38
Martinais (Morbihan)	95,2	77,9	1,22	1 049,5	1,61	52,0	45,6	1,14	44,0	45,6	0,96	164	45,6	134	45,6	2,94	1 004,5	2,60	126	45,0	2,80
Petit Gars (C.-d.-N.)	105,4	73,8	1,43	1 049,0	1,22	44,0	31,2	1,41	22,0	28,0	0,78	156	32,4	120	26,8	4,47	1 032	1,76	116	27,0	4,29
Maximum	189,6	100,3	2,52	1 063	2,49	66,0	52,8	1,57	56,0	45,6	1,66	200	51,6	170	51,6	5,35	1 032	3,33	164	45,0	4,77
Minimum	58,7	60,6	0,88	1 038	0,93	24,0	24,0	0,55	22,0	25,2	0,70	124	24,0	96	22,8	2,45	999,5	1,76	80	19,4	2,67
Moyenne	114,6	76,7	1,49	1 049,8	1,58	46,9	40,5	1,16	40,5	37,0	1,09	157,8	40,4	135,4	37,2				129,9	35,1	

remarquerons que sur 20 échantillons, 5 sont entrés en fermentation sans déféquer. Pour les jus ayant été additionnés de sel défécant ($CaCl_2$) la teneur moyenne en Ca passe de 157,8 à 135,4 mg par litre au cours de la défécation, soit une perte moyenne de 22 mg de Ca par litre (14,2 p. 100) et pour Mg, comme dans le cas de défécation naturelle, la teneur moyenne passe de 40,4 à 37,2 mg par litre. Il est à noter que l'apport de sel défécant a permis d'obtenir une défécation classique avec montée de chapeau brun dans 19 échantillons sur 20. Un seul (Marin Onfroy) n'a pas donné de chapeau brun et a été soutiré sur fortes lies. Pour tous les autres, la défécation a été beaucoup plus prononcée, coagulum plus épais, chapeau plus compact, et presque toujours plus rapide que dans les jus ayant déféqué naturellement.

Influence de la fermentation

Les échantillons ayant déféqué après addition de $CaCl_2$ ont été soutirés, puis abandonnés à la fermentation naturelle en bonbonnes. Lorsque leur densité s'est stabilisée naturellement par carence d'azote, à des valeurs comprises entre 1 000 et 1 032, c'est-à-dire pour des teneurs en sucres totaux allant de 0 à 70 g par litre, les échantillons ont été mis en bouteilles et soumis à une dernière analyse. La fermentation a duré de 6 à 10 mois selon les variétés. A ce stade, les cidres ont conservé pratiquement la teneur en Ca et Mg qu'ils possédaient au soutirage après défécation. Leur richesse moyenne est en effet de 130 mg par litre contre 135,4 pour le calcium et de 35,1 mg par litre contre 37,2 pour le magnésium. Les lies et les cellules de levure se déposant au cours de la fermentation n'entraînent donc qu'une fraction pratiquement négligeable de ces deux éléments, et on peut dire que la fermentation n'appauvrit pas sensiblement le moût en alcalino-terreux.

D'après cette série d'essais on peut donc déduire qu'un cidre pur jus renferme en moyenne 35 mg de magnésium par litre, et que sa teneur en calcium sera variable selon qu'il aura reçu ou non un apport de sel défécant. Le chapitre suivant se rapportant à une série de cidres industriels nous permettra d'ailleurs de nous faire une opinion mieux fondée à ce sujet.

3° Cidres industriels.

Après l'étude de pommes et de poires de variétés connues, nous avons pensé fournir un bon complément à ce travail en y faisant figurer les résultats analytiques portant sur plus de cinquante échantillons de cidres industriels provenant des principales cidreries des régions cidricoles et que pour des raisons faciles à comprendre nous désignons par les premières lettres de l'alphabet. Le tableau IV rassemble avec la densité et l'acidité

de titration de chaque échantillon, sa teneur en calcium et magnésium. L'étude de ce tableau renforce en général les conclusions déduites des résultats obtenus sur les pommes à cidre et consignés dans le tableau III. C'est ainsi que nous trouvons dans les cidres industriels d'origines diverses une teneur moyenne en magnésium de 39,3 mg par litre. Les deux échantillons de poiré accusent des teneurs en Mg de 72 et 73,2 mg par litre, chiffres qui se rapprochent de ceux obtenus sur la collection de poires du verger de l'E. N. A. qui avaient fourni une teneur moyenne de 67,4 mg par litre. Le maximum de 82 mg par litre observé dans les cidres industriels s'explique par le fait qu'il se rapporte à un moût de pommes ayant été concentré au moins à la moitié de son volume initial par cryoconcentration, ses éléments rapportés au litre, ont donc été doublés par cette opération. Les deux minima 6 et 18 mg par litre (échantillons H.2 et H. 5) qui constituent des anomalies se rapportent à des essais industriels de

Tableau IV

Cidres industriels.

Échantillon	Densité	Acidité en g SO_4H_2 par litre	mg/litre		Ca/Mg
			Ca	Mg	
A 1...	1 007	2,20	162	32,5	5,0
2...	1 021	2,40	170	39,6	4,3
3...	1 014	2,00	158	39,6	4,0
4...	1 015	2,35	154	42,0	3,7
5...	1 022	2,50	184	43,2	4,2
6...	1 019	2,05	174	37,2	4,7
7...	1 008	2,30	168	33,6	5,0
8...	1 004	2,05	148	36,0	4,1
9...	1 008	2,15	118	39,6	3,0
10...	1 010	2,30	168	38,4	4,4
B 1...	1 006	2,30	102	37,2	2,7
2...	1 011	2,70	162	36,0	4,5
3...	1 006	2,60	156	43,2	3,6
4...	1 020	2,30	180	36,0	5,0
5...	1 033	1,70	122	34,8	3,5
6...	1 027	1,90	124	33,6	3,7
C 1...	1 026	2,60	74	45,6	1,6
2...	1 003	3,00	58	45,6	1,3
D 1 (1).	1 110	4,50	190	82,0	2,3
2...	1 048	2,65	68	33,6	2,0
3...	1 041	2,90	88	36,0	2,4
4...	1 034	2,90	104	28,8	3,6
5...	1 034	4,45	94	34,8	2,7
6...	1 025	2,40	86	32,4	2,6
7...	1 014	2,40	106	32,4	3,3
8...	1 032	2,30	88	33,6	2,6
9...	1 024	2,40	46	31,2	1,5
E 1...	1 052	1,80	56	38,4	1,5
2...	1 051	5,35	76	50,4	1,5
3...	1 043	2,35	50	32,4	1,5
4...	1 042	2,70	46	39,6	1,2
E 5...	1 030	2,40	50	38,4	1,3
6...	1 015	2,25	42	37,2	1,1
F 1 (poiré)	1 011	4,25	226	73,2	3,1
F 2 (poiré)	1 011	6,80	124	72,0	1,7
3...	1 037	4,65	98	54,0	1,8
4...	1 039	4,70	196	50,4	3,9
5...	1 039	2,60	80	36,0	2,2
6...	1 041	2,55	94	34,8	2,7
7...	1 029	2,30	142	37,2	3,8
G 1...	1 035	3,77	70	37,2	1,9
2...	1 050	3,68	64	36,0	1,8
3...	1 044	3,85	82	40,8	2,0
4...	1 049	3,68	76	26,4	2,9
5...	1 049	5,05	56	44,4	1,2
6...	1 046	4,75	50	46,8	1,1
H 1...	1 046	2,70	128	43,2	3,0
2 (2).	1 038	2,90	18	18,0	1,0
3...	1 031	1,75	132	38,4	3,4
4...	1 028	1,55	80	36,0	2,2
5 (2).	1 043	3,40	34	6,0	5,7
I 1...	1 030	3,25	70	42,0	1,7
2...	1 038	2,90	60	38,4	1,5
3...	1 041	2,20	50	39,6	1,3
4...	1 024	2,30	42	32,4	1,3
Cidre belge.	1 029	2,65	60	45,6	1,3
Max. .			226	82	5,7
Min. ..			18	6	1,0
Moy. .			103,6	39,3	

(1) Moût concentré au froid (cryoconcentrateur Daubron).
(2) Échantillon ayant été traité sur colonne échangeuse d'ions. pH = 2,70 et 2,60.

déminéralisation de cidres sur colonnes échangeuses d'ions. Ce traitement a d'ailleurs eu comme résultat l'obtention de cidres de composition anormale (pH : 2,70 et 2,60 ; teneur en matières minérales : 0,910 g et 0,835 g par litre qui les rend non conformes à la législation en vigueur).

Les teneurs en calcium sont beaucoup plus variables que les teneurs en magnésie, surtout du fait du mode de travail des diverses cidreries. Les usines qui utilisent systématiquement les sels défécants sont immédiatement caractérisées par les fortes teneurs de leurs produits en calcium qui s'établissent entre 100 et 180 mg par litre, tel est le cas pour les usines A et B. Celles où les sels de chaux ne sont pas employés, comme les cidreries C, E, G, I, présentent des cidres où la teneur en Ca est toujours inférieure à 80 mg par litre, la moyenne étant de 60 mg par litre. Enfin d'après les fluctuations importantes constatées pour quelques usines (D, F, H) on a l'impression que l'addition de sels défécants est occasionnelle ou n'est pas appliquée systématiquement à toute la fabrication.

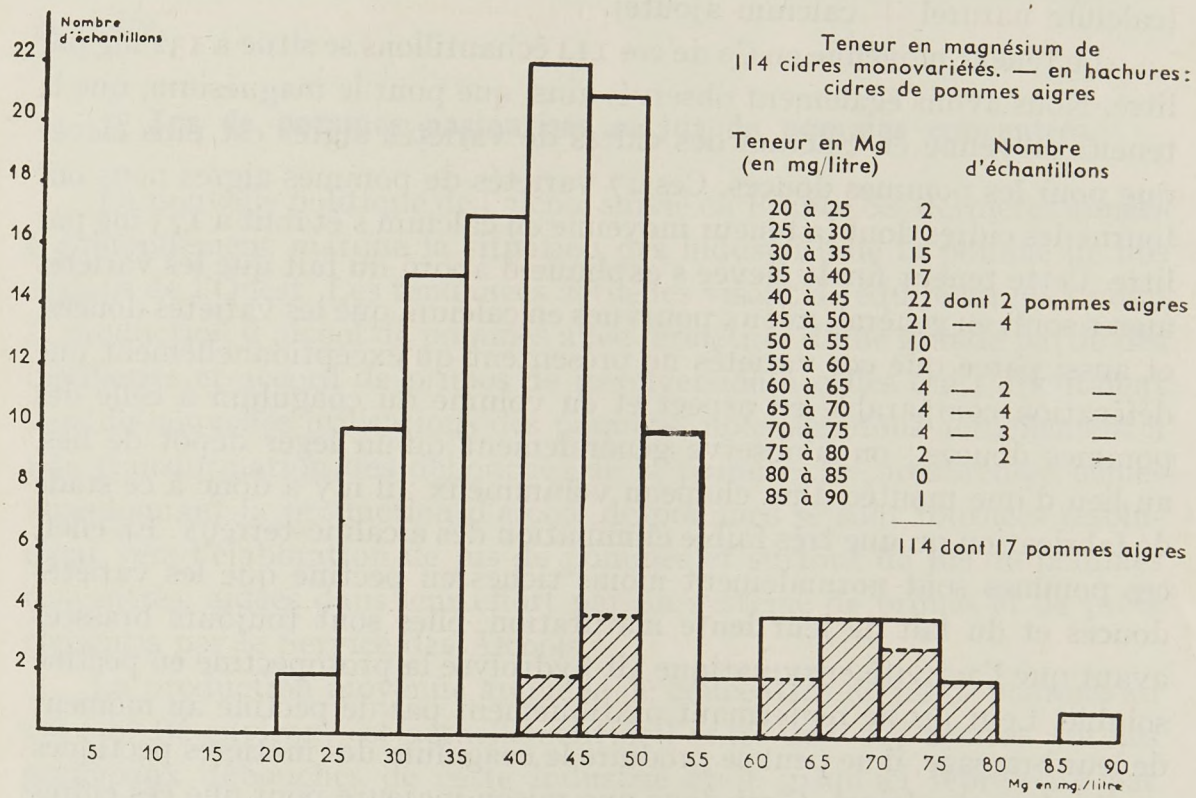
La conséquence directe de l'emploi facultatif de sels de chaux en cidrerie se reflète directement dans le rapport Ca/Mg ; le magnésium étant un facteur pratiquement constant, et le calcium présentant par contre de grandes fluctuations, le rapport varie avec le calcium de 1 à 5. Les cidres préparés sans sels défécants présentent un rapport Ca/Mg compris entre 1,0 et 2,0 avec une moyenne de 1,5. Par contre, ceux élaborés avec addition de sels de chaux ont un rapport Ca/Mg généralement compris entre 3 et 5, la plus grande partie du calcium provient alors du sel de chaux apporté.

4° Cidres d'étude de variétés séparées.

Les échantillons de cidres pur jus provenant de variétés séparées envoyées à notre Station ces dernières campagnes en vue de leur étude technologique ont été également soumis à l'analyse pour y déterminer leur teneur en calcium et magnésium. Tous ces échantillons ayant été additionnés de chlorure de calcium pour en favoriser la défécation, c'est surtout leur teneur en magnésium qui retiendra notre attention. Cette étude a porté sur 114 variétés de pommes à cidre provenant des diverses régions cidricoles dont 17 variétés dites aigres (acidité de titration supérieure à 4 g par litre exprimés en SO_4H_2). Elle peut donc prétendre nous donner une étude statistique valable de la teneur des cidres pur jus en magnésium. Les valeurs extrêmes sont les suivantes : deux variétés : Petit Amer, de la Manche ; Merkalina, du Pays Basque présentent le minima de 24 mg par litre de magnésium. Les maxima trouvés sont : 74,4 mg par litre pour Fréquin Rouge, d'Ille-et-Vilaine et 88 mg par litre pour Gros Doux d'Ille-et-Vilaine, deux pommes douce-amère et douce ; et pour les pommes aigres : 75,6 mg par litre pour Jaune de Vitré (Ille-et-Vilaine) et 76,8 mg par litre pour Portier (Mobihan), les minima observés pour cette

catégorie étant de 43,2 mg par litre (Coco Goria, Pays Basque) et 44,4 mg par litre (Gilet Rouge, Mayenne).

Pour ne pas alourdir ce mémoire d'un tableau rapportant les résultats de ces dosages, nous les avons groupés sur un graphique portant en abscisses les teneurs en magnésium exprimées en mg par litre, et chiffrées de 5 en 5 mg et en ordonnées le nombre d'échantillons présentant une même richesse comprise dans une zone de 5 mg. Un examen rapide de ce graphique montre immmédiatement que la majorité des cidres analysés (75 sur 114), se situe dans la zone 30 à 50 mg de Mg par litre. Pour les 114 cidres, la moyenne générale est de 45,6 mg par litre. Si nous séparons



Teneur en magnésium de 114 cidres monovariétés. — en hachures: cidres de pommes aigres

Teneur en Mg (en mg/litre)	Nombre d'échantillons	
20 à 25	2	
25 à 30	10	
30 à 35	15	
35 à 40	17	
40 à 45	22	dont 2 pommes aigres
45 à 50	21	— 4 —
50 à 55	10	
55 à 60	2	
60 à 65	4	— 2 —
65 à 70	4	— 4 —
70 à 75	4	— 3 —
75 à 80	2	— 2 —
80 à 85	0	
85 à 90	1	
	114	dont 17 pommes aigres

les variétés en variétés aigres (au nombre de 17) et douces, nous obtenons les moyennes suivantes : 42,8 mg par litre pour les variétés douces, et 61,2 mg par litre pour les variétés aigres. Il est donc évident que l'acidité a une influence directe et notable sur la richesse de la variété en magnésium sans cependant obéir à une proportionnalité rigide.

Le chiffre moyen de 42,8 mg par litre de Mg pour les pommes douces est très voisin de la moyenne obtenue au tableau IV des cidres industriels : 39,3 mg par litre. Si l'on veut bien admettre que tous les échantillons industriels ne sont pas des purs jus, mais des cidres présentant simplement un degré alcoolique supérieur à 5°, alors que les échantillons préparés à notre Station sont tous des purs jus, on peut conclure que ces deux chiffres moyens se confirment mutuellement, et qu'il est normal que la moyenne de cidres, dans la fabrication desquels rentre presque toujours une petite proportion d'eau par diffusion ou rémiage des marcs de pre-

mière pression soit légèrement inférieure à celle fournie par des boissons strictement pur jus.

Les teneurs en calcium de ces cidres de variétés pures sont généralement assez élevées puisque, comme il a été dit plus haut, ils ont tous été additionnés de chlorure de calcium, à la dose moyenne de 110 mg. de Ca par litre, pour en favoriser la défécation. Les chiffres extrêmes observés sont de 76 mg et de 230 mg par litre de Ca. Ainsi malgré l'apport de sel de calcium, l'élimination de ce métal par la défécation et la fermentation peut être exceptionnellement très importante puisqu'on aboutit parfois dans la boisson faite à environ 50 p. 100 de sa teneur en calcium initial (calcium naturel + calcium ajouté).

La teneur moyenne en Ca de ces 114 échantillons se situe à 132 mg par litre. Nous avons également observé, ainsi que pour le magnésium, que la teneur moyenne en calcium des cidres de variétés aigres est plus élevée que pour les pommes douces. Ces 17 variétés de pommes aigres nous ont fourni des cidres dont la teneur moyenne en calcium s'établit à 173 mg par litre. Cette teneur finale élevée s'explique d'abord du fait que les variétés aigres sont, en général, mieux pourvues en calcium que les variétés douces, et aussi parce que ces variétés ne présentent qu'exceptionnellement une défécation comparable en aspect et en volume du coagulum à celle des pommes douces ; on n'observe généralement qu'un léger dépôt de lies, au lieu d'une montée d'un chapeau volumineux ; il n'y a donc à ce stade de fabrication qu'une très faible élimination des alcalino-terreux. En effet, ces pommes sont normalement moins riches en pectine que les variétés douces et du fait de leur lente maturation, elles sont toujours brassées avant que l'activité enzymatique ait hydrolysé la protopectine en pectine soluble. Leur jus ne renfermant pratiquement pas de pectine au moment de leur brassage, il ne peut se produire le coagulum des matières pectiques combinées au calcium. C'est donc une raison majeure pour que ces cidres de variétés aigres restent plus riches en calcium que les cidres de variétés douces.

En plus de ces cidres mono-variété, quatre poirés de variétés pures brassés à notre Station, mais sans addition de sels défécants, ont été analysés après fermentation. Le tableau V ci-dessous rend compte des résultats obtenus pour les dosages de calcium et de magnésium.

TABLEAU V. — *Poirés de variétés pures. Analyse après fermentation.*

Variétés	Acidité totale en g SO_4H_2	Calcium en mg	Magnésium en mg	Rapport Ca/Mg
Coignet	6,50	78	90	0,86
Fausset	4,75	60	70	0,86
Muscadet	6,42	76	70	1,09
Rouge Vigny	5,65	44	67,2	0,65

Ces valeurs de Ca et de Mg sont très comparables à celles présentées dans le tableau D relatif à la pulpe et au jus des poires à poiré. On peut donc conclure ici aussi, comme pour les pommes aigres, que la fermentation ne provoque pas d'élimination sensible des alcalino-terreux, et ceci pour les mêmes raisons : brassage des fruits avant qu'ils ne contiennent de la pectine soluble, donc pas de coagulation de composés pectiques alcalino-terreux.

On retiendra surtout de ce tableau que les poirés sont relativement riches en magnésium, et que cette richesse ne s'explique pas uniquement par leur acidité, mais peut être considérée comme une caractéristique de la poire.

5° Jus de pommes pasteurisés et jus de pommes concentrés.

La nouvelle politique de l'alcool suivie en France ces dernières années a profondément marqué la situation des industries de la pomme de nos régions de l'Ouest. Les tendances actuelles visant à réduire au maximum la production d'alcool de pommes avec fermeture d'une grande partie des distilleries et accord de primes de reconversion à celles qui s'orientaient vers de nouvelles utilisations des pommes, nous assistons actuellement à une transformation des débouchés de la pomme. De nombreuses usines abandonnant la production d'alcool de pommes se sont tournées résolument vers l'élaboration de jus de pommes et surtout de jus de pommes concentrés, aidées dans leur effort par un système de primes et de prêts consentis par le Service des Alcools.

La production moyenne annuelle de concentrés de jus de pommes au 1/6 (38° Bé environ) est actuellement de l'ordre de 6 000 tonnes. Un des principaux débouchés de cette industrie était jusqu'ici représenté par l'exportation vers la Suisse et l'Allemagne surtout en année de production de pommes déficitaire dans ces pays. Depuis la présentation sur le marché d'un nouveau type de cidre : le cidre doux défini par le Décret du 20 mai 1955, qui s'est attiré rapidement une clientèle importante aussi bien dans les régions cidricoles que dans les régions méridionales, cette nouvelle fabrication a procuré au concentré de jus de pommes un nouvel et important débouché qui ne peut que tendre à s'accroître avec la préférence de plus en plus marquée du public pour les boissons sucrées peu ou pas alcoolisées. Le concentré est également utilisé en limonaderie pour la fabrication de limonades et sodas, ainsi que par dilution à 6-8 fois dans de l'eau fraîche ; il présente sous cette dernière forme une boisson hygiénique et économique pour les collectivités d'enfants et de jeunes gens.

La fabrication de jus de pommes tend également à se développer et plusieurs industriels étudient actuellement la reconversion de leurs usines vers cette branche. Il est évident qu'il reste beaucoup à faire en

France en faveur de la consommation des jus de fruits, la consommation du Français étant inférieure à 0,5 litre de jus de fruits par an, alors qu'aux États-Unis elle dépasse 30 litres par an. Malgré la variété et la multiplicité des boissons qui s'offrent aux consommateurs français, les jus de fruits et le jus de pommes en particulier peuvent prétendre se créer une place beaucoup plus favorable sur le marché français, s'ils sont offerts à des prix plus à la portée du consommateur moyen, et également sur les marchés étrangers qui ne sont pas saturés et qui seront intéressés par nos produits s'ils sont de qualité.

Croyant en l'avenir de ces produits de l'industrie de la pomme, nous avons voulu compléter ce travail par les analyses de quelques jus de pommes industriels et de quelques jus de pommes concentrés fabriqués dans les principales usines spécialisées de notre région. Les tableaux VI et VII rassemblent les résultats analytiques obtenus sur ces deux catégories de produits.

TABLEAU VI

Jus de pommes sans alcool.

Origine	Densité à 15° C	Acidité g SO_4H_2/litre	Calcium mg/litre	Magnésium mg/litre	Rapport Ca/Mg
L 1	1047,3	4,70	66	49,2	1,34
2	1048,2	4,26	48	52,8	0,91
3	1047,3	4,55	48	45,6	1,05
O 1	1046,5	2,15	52	53,4	0,97
2	1050,0	1,91	50	54,6	0,91
P 1	1049,0	3,77	54	45,6	1,18

Le tableau VI relatif aux analyses de jus de pommes pasteurisés présente des valeurs en Ca et Mg très voisines et comparables à celles fournies dans le tableau I pour les jus de pommes de table ; les pommes à jus ont en effet une composition très voisine de celle des pommes de table, il faut qu'elles présentent une certaine acidité afin que le jus soit caractérisé par un rapport sucre/acidité favorable au goût ; il s'ensuit que ces jus sont relativement riches en Mg par rapport au Ca et que le rapport Ca/Mg est très voisin de 1.

Le tableau VII indique, compte tenu de la concentration, que les deux éléments qui nous intéressent y restent présents dans les mêmes proportions que dans les jus de pommes industriels. Les teneurs en Ca et Mg par kg de concentré représentent bien environ 6 à 7 fois les teneurs trouvées dans 1 litre de jus de pommes ou de poires. Les teneurs en Ca sont anormalement élevées dans deux échantillons B1 et B2 où elles atteignent 630 et 640 mg par kg, avec des rapports Ca/Mg supérieurs à 2 ; ce qui laisse supposer que dans cette usine, les moûts sont additionnés de sels de chaux et mis à déféquer avant d'être soumis à la concentration, ainsi que les

moûts destinés à la fabrication du cidre. Le tableau IV relatif aux cidres industriels indique d'ailleurs pour les cidres de cette cidrerie des doses de Ca variant de 102 à 180 mg par litre avec un rapport Ca/Mg allant de 2,7 à 5,0.

TABLEAU VII

Jus de pommes concentrés.

Origine	Densité en Degrés Baumé	Calcium mg/kg	Magnésium mg/kg	Rapport Ca/Mg
Usine B 1 (pommes)	39,30	640	218	2,93
Usine B 2 (pommes)	39,45	630	258	2,44
Usine B 3 (poires)	39,2	400	360	1,11
Usine K 1 (poires)	38,85	560	400	1,40
Usine K 2 (pommes)	38,0	400	243	1,65
Usine K 3 (pommes)	37,75	320	267	1,19
Usine K 4 (pommes)	37,75	340	220	1,54
Usine K 5 (pommes)	38,4	560	296	1,89
Usine K 6 (pommes)	37,95	390	255	1,53
Usine K 7 (pommes)	38,0	360	255	1,41
Usine L 1 (pommes)	38,4	310	222	1,40
Usine M 1 (pommes)	37,0	370	246	1,50
Usine N 1 (pommes)	38,25	270	222	1,21
Usine O 1 (pommes)	37,85	320	280	1,14

La conclusion à tirer des chiffres du tableau VII est que la concentration conserve intégralement les alcalino-terreux du jus frais, et que la dilution à 6-7 fois son volume du concentré présente à cet égard la même composition minérale que le jus originel.

6° **Bières.**

A titre de complément d'information, et afin de comparer les cidres avec les bières, qui peuvent, à un certain point de vue, être considérées parmi toutes les boissons comme leur concurrente la plus directe, nous avons procédé à l'examen de quelques bières types commercialisées dans l'Ouest, bières de table et bières de luxe. Nous avons rassemblé les résultats de ces analyses dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Bières.

Origine	Densité	Acidité g SO_4H_2/litre	Calcium mg/litre	Magnésium mg/litre	Rapport Ca/Mg
A (table)	1015	1,00	36	64,8	0,55
B_1 Monopole	1014	0,65	38	73,2	0,53
B_2 Royale	1012	0,80	36	75,6	0,47
C	1014	0,70	48	74,4	0,64
D_1 (table)	1014,5	1,05	58	85,2	0,68
D_2	1013	0,70	72	88,8	0,81
D_3 4°8	1015	0,80	38	82,8	0,46
D_4 5°5	1017	0,80	36	86,4	0,42
E Rhedonia	1013	0,75	20	74,4	0,27
E Siria	1015	0,80	22	85,2	0,26

L'examen de ces données fait ressortir la richesse relative de ces bières en magnésium, surtout par rapport à leur teneur en calcium qui est parfois très faible : 20 mg par litre, le rapport Ca/Mg étant de ce fait le plus bas que nous ayons trouvé jusqu'ici : 0,26. Ces résultats ne sont pas surprenants si l'on veut bien penser que les sels rencontrés dans les bières proviennent principalement des eaux utilisées dont la composition saline est très variable selon l'origine et que les eaux de brasserie sont généralement traitées sur permutite ou sur échangeurs d'ions pour éliminer les cations gênants (sels de calcium plus particulièrement) et sont ensuite additionnées des sels désirés dont l'action est reconnue favorable sur la couleur ou la saveur de la bière (sulfate par exemple pour obtenir des bières pâles se clarifiant bien).

Par rapport aux cidres, ces bières sont donc moins riches en calcium, mais présentent par contre des teneurs en magnésium doubles, et au moins égales sinon supérieures à celles rencontrées dans les jus de poires et les poirés.

IV. — INTERPRÉTATION TECHNOLOGIQUE

Un des deux éléments auxquels ce travail se rapporte, le calcium, n'était pas pour nous un inconnu, puisque TAVERNIER et BEJAMBES l'avaient déjà dosé dans le jus d'un certain nombre de variétés de pommes à cidre. A ce sujet l'intérêt de notre étude se rapporte donc plutôt à la présence du calcium et du magnésium dans les fruits à pépins en général et à leur devenir au cours des transformations subies par voie mécanique ou biochimique. Nous attachons donc un intérêt particulier à l'étude de l'évolution des deux éléments Ca et Mg au cours de la transformation de la pomme en cidre, telle qu'elle est résumée par le tableau III. Les résultats rassemblés dans ce tableau se rapportent à vingt variétés de pommes à cidre, travaillées toutes suivant la même technique. On peut résumer cette série d'expériences en insistant sur le fait que la majeure partie du calcium reste fixée sur le marc, alors qu'un peu plus de la moitié du magnésium passe dans le jus de pression. Du point de vue nutritionnel, il est donc beaucoup plus profitable de consommer un fruit entier plutôt que de n'en boire que le jus ; ce qui est vrai pour les sels minéraux doit sans doute pouvoir être étendu à beaucoup d'autres constituants, nous pensons en particulier à la vitamine C.

Au point de vue technologique, l'apport de sels de chaux est recommandé pour assurer et accélérer la défécation, à condition évidemment, de travailler des fruits mûrs, donc contenant de la pectine soluble. Le tableau III nous montre que sur 20 échantillons étudiés, cinq n'ont pas déféqué naturellement, alors qu'après addition de chlorure de calcium, tous les échantillons ont subi la défécation, plus ou moins importante. Le

moût de pommes mûres réagit donc favorablement à l'apport modéré de sels de chaux qui assurent un coagulum plus volumineux, plus compact et un gain de temps d'environ 48 heures, ce qui est important pour les problèmes de cuverie en pleine fabrication. Mais nous insistons encore sur la nécessité absolue pour réussir la défécation pectique de brasser des fruits ayant atteint leur maturité de brassage, car la condition indispensable pour réussir la défécation est de traiter un moût renfermant de la pectine.

Répétons encore à l'intention des industriels que le sel de calcium le plus facile à utiliser pour la défécation est le chlorure qui présente les avantages : d'être entièrement soluble, de ne pas alcaliniser le milieu et d'apporter à la fois l'ion Ca favorable à la coagulation des matières pectiques et l'ion Cl facilitant la rétraction du coagulum. Pour l'emploi, faire une solution à 400 g par litre de chlorure de calcium technique, pureté 96-97 p. 100 de formule $CaCl_2$, $2H_2O$. Une telle solution apportera environ 100 g de Ca par litre et sera utilisée à raison de 1 litre pour 10 hl de moût à déféquer, ce qui correspond à 100 mg de Ca par litre. On n'a jamais intérêt à dépasser cette dose.

Nous avons vu que les moûts de pommes destinés à la concentration sont parfois additionnés de sels de chaux et vraisemblablement soumis à la défécation avant d'être envoyés au concentrateur (échantillons B^1 et B_2 du tableau VII).

A notre avis, cet apport de sels défécants à des moûts destinés à la concentration est inutile. Tout d'abord la défécation fait perdre du temps puisqu'elle nécessite au moins 48 heures pour se produire ; dans cette fabrication elle ralentit donc inutilement le rythme du travail. De plus, son action sur les matières pectiques est incomplète et insuffisante, car il en subsiste dans le jus. Or le point primordial en concentration de jus c'est la mise hors circuit des substances pectiques susceptibles de gélifier, et de transformer le concentré en une gelée au cours du stockage, accident qui se produisait avant 1939, alors que les enzymes de filtration étaient encore inconnus en cidrerie . Le seul traitement logique et rationnel à faire subir à un moût destiné à la concentration consiste donc à l'additionner d'une quantité d'enzymes de filtration (à base d'un mélange de polygalacturonase et de pectine-méthylestérase) calculée d'après les conditions de travail (température et durée de contact) et surtout d'après la teneur du moût considéré en pectine. (Cette évaluation s'effectue facilement à l'aide d'un viscosimètre d'Ostwald suivant le mode opératoire indiqué dans une publication précédente (21).)

L'enzyme de filtration déméthyle la pectine et clive la chaîne pectique en courts chaînons par hydrolyse des liaisons glucosidiques 1-4 des acides polygalacturoniques. La molécule de pectine ainsi déméthylée et clivée en plus petits éléments perd ses propriétés gélifiantes et sa viscosité et le jus devient facile à filtrer. Le moût ainsi traité pourra être soumis à

un collage à la gélatine, suivi d'une centrifugation ou d'une filtration pour le clarifier avant son envoi au concentrateur.

La défécation appauvrit un peu le moût en magnésium, un peu plus en calcium et la fermentation accentue encore légèrement les pertes en Ca et Mg, mais celles-ci sont presque négligeables et ne dépassent pas 4-5 p. 100. La teneur des cidres en magnésium est assez constante et on peut retenir comme chiffre moyen 40 mg de magnésium dans 1 litre de cidre industriel. Le calcium est beaucoup plus variable et pour plusieurs raisons; en premier l'origine de la pomme, les terrains calcaires donnant généralement des fruits plus riches en Ca, puis l'acidité du fruit intervient, les fruits étant en gros, d'autant mieux pourvus en Ca qu'ils sont plus acides ; enfin le facteur le plus important est technologique, les cidres fabriqués dans les cidreries travaillant régulièrement par apport de sels défécants se distinguent très nettement par leur teneur finale en calcium de ceux n'ayant pas reçu de sels de chaux, la teneur moyenne d'un cidre en calcium pourra évoluer dans le premier cas aux environs de 150 mg par litre et dans le second se situer entre 40 et 50 mg par litre, moyenne représentant le calcium naturel passant du fruit dans le jus de pression.

Il est enfin intéressant de souligner que la poire à poiré se distingue une fois de plus de la pomme par une dose en magnésium presque double, de sorte que s'ils sont d'une richesse en calcium comparable à celle des cidres, les poirés se singularisent par une teneur en magnésium variant entre 1,5 à 2 fois celle des cidres.

Rappelons enfin l'intérêt de la concentration des jus de pommes qui ne modifie pas la composition minérale du jus frais et permet de retrouver intégralement dans le produit fini, ou dans sa future dilution tous les constituants originels et cela dans le même état d'équilibre.

V. — CONCLUSIONS

Depuis une quinzaine d'années, notre Station a consacré la plus grande partie de ses activités vers la recherche d'une meilleure connaissance de la matière première : la pomme et des produits fabriqués, ou en cours d'élaboration. Cette orientation de nos travaux n'a jamais perdu de vue l'intérêt technologique qui doit logiquement en découler et nous avons toujours cherché à les valoriser dans ce sens, ayant la constante ambition de mettre à la disposition des techniciens des industries de la pomme, une somme toujours plus grande de connaissances aussi approfondies que nos moyens nous le permettent.

Les industriels de la profession sont ainsi mis en mesure d'extraire de nos travaux des règles de fabrication toujours plus précises, plus scientifiques, leur permettant d'éliminer de plus en plus complètement la

routine et de donner à leurs productions les bases rationnelles qui leur ont fait longtemps défaut.

Nous pensons donc apporter par ce mémoire un élément de plus à l'œuvre collective et faire avancer d'un pas nos aspirations vers une parfaite connaissance de la matière première nécessaire pour l'orienter vers l'utilisation la plus rationnelle en fonction de ses qualités intrinsèques et pour diriger dans le sens souhaité la suite des transformations qu'elle est ainsi destinée à subir pour devenir un produit fini de grande classe.

Reçu pour publication le 20 mai 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) WARCOLLIER (G.). — Fabrication d'un cidre doux (1er Mémoire). *Assoc. Franç. Pomol.* Congrès Pomologique de Vitré, 1904. — Production d'un cidre se conservant doux. *Assoc. Franç. Pomol.* Congrès Pomologique de Cherbourg, 1905. — Défécation des moûts ou fermentation dite « tumultueuse » des cidres. *Assoc. Franç. Pomol.* Congrès Pomologique de Laval, 1906. — Étude sur la fabrication et la conservation du cidre. *Assoc. Franç. Pomol.* Congrès Pomologique du Mans, 1907. — Procédé d'obtention d'un cidre se conservant doux (3e Mémoire). *Assoc. Franç. Pomol.* Congrès Pomologique de Saint-Brieuc, 1908. — Emploi du sel marin dans la fabrication du cidre. *Assoc. Franç. Pomol.*, 1913. — Contribution à l'étude des cidres se conservant naturellement doux et sucrés. — Congrès de la Pomme, Rennes, 1921. — Contribution à l'étude de la fabrication du cidre. *Assoc. Franç. Pomol.* — Congrès Pomologique de Rennes 1926. — Cidrerie. Librairie Baillière, éditeur, Paris 1928.

(2) JACQUIN (P.). — Pectine-méthylestérase et matières pectiques dans la pomme et la poire. Leur importance dans la fabrication des cidres et des poirés. Ann. I. N. R. A., *Technol.*, **4**, 1, 67, 1955.

(2) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — Test viscosimétrique pour déterminer l'aptitude à la défécation des moûts de pommes à cidre. *Indust. Agric. et Alim.*, **73**, 3, 161, 1956.

(3) FREMY (E.). — Recherches sur la pectine et l'acide pectique. *Journ. Pharm. et Chim.*, **26**, 368, 1840.

(4) BERTRAND (G.) et MALLEVRE (A.). — Sur la pectase et sur la fermentation pectique. *C. R. Acad. Sci.*, **119**, 1012, 1894.— Recherches sur la pectase et la fermentation pectique. *Bull. Soc. Chim.*,**13**, 77, et 252, 1895.

(5) LOUÏSE. — Contribution à l'étude du cidre. *Sté Nat. Agric. Fr.*, **426**, 1901. — La fabrication du cidre. *Sté Nat. Agric. Fr.*, **465**, 1901.

(6) TAVERNIER (J.). — Rapport sur les travaux entrepris au cours de la campagne cidricole 1950-51 à la Station de Recherches Pomologiques et Cidricoles de Rennes. Un nouveau défécant pour la cidrerie. *Syndicat Nat. des Cidriers et Fabricants d'Eaux-de-Vie de Cidre.* Juin 1951.

(7) BROWN (J. W.). — Chemical studies in the physiology of apples. — V. Methode of ash analysis and the effect of environment on the mineral constitution of the apples. *Ann. Botany*, **40**, 129, 1926.

(7) HOPKINS (E . F.) and GOURLEY (S. H.). — *Ohio Agric. Exp. Stat. Bull.*, **519**, 1933.

(7) KERTESZ (Z. I.), d'après SMOCK (R. M.) et NEUBERT (A. M.). — Apples and Apple Products. Interscience Publishers Inc. New York, 1950

(8) Bejambes (M.) et Tavernier (J.). — Sur la teneur en calcium des moûts de pommes à cidre. *Bull. Assoc. Chim.*, **62**, 4-5-6, 135, 1945.
(9) Causeret (J.). — Les éléments minéraux dans l'alimentation de l'homme. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **41**, 4, 5, 6, 67, 1953.
(10) Demolon (A.). — Croissance des végétaux. Dunod, éditeur, Paris, p. 199, 1934.
(11) Javillier (M.). — Les éléments chimiques et le monde vivant. Flammation éditeur, Paris 1952. — Les besoins alimentaires des végétaux cultivés et les engrais chimiques. *Bull. Assoc. Chim.*, **61**, 3-4, 109, 1944. — Les exigences en magnésium des plantes, des animaux et de l'homme. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **40**, 4-5-6, 73, 1952.
(12) Trocmé (S.). — Observations sur la carence en magnésium du pommier. *C. R. Acad. Agr.*, **38**, 1, 49, 1952.
(13) Lavollay (J.). — Recherches sur le magnésium en chimie animale. Collection Act. Scient. et Ind. Hermann éditeur, 1936.
(14) Randoin (L.) et Causeret (J.). — Recherches expérimentales relatives à l'influence de la teneur du régime alimentaire en phosphore, en calcium en magnésium et en vitamine D sur la croissance pondérale du rat blanc. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **33**, 10-11-12, 123, 1945. — Recherches expérimentales relatives à l'influence de la teneur du régime alimentaire en phosphore, en calcium, en magnésium et en vitamine D sur le développement osseux du rat blanc. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **33**, 10-11-12, 134, 1945. — L'effet défavorable qu'exercent de fortes doses de magnésium sur la croissance du rat dépend-il de la teneur du régime alimentaire en calcium, et inversement? *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **35**, 7-8-9, 179, 1947.
(15) Delbet (P.). — *Bull. Ac. Méd.*, **128**, 653, 1944 d'après Randoin (L.) et Fournier (P.). — Recherches sur les teneurs en phosphore, en calcium et en fer des feuilles de Petroselinum sativum Hoffmann, source exceptionnellement riche de calcium et surtout de fer. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **35**, 7-8-9, 184, 1947.
(16) Shermann (H. C.). — Chemistry of Food and Nutrition, p. 96. Macmillan éditeur, 7e édition, New York, 1946.
(17) Lavollay (J.), Patron (S. A.) et Patron (A.). — La composition chimique des fruits envisagée au point de vue alimentaire. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **39**, 7-8-9, 145, 1951.
(18) Schwarzenbach (G.), Biedermann (W.) und Bangerter (F.). — Komplexone VI-Neue einfache Titrationmethoden zur Bestimmung der wasserharte.*Helv. Chim. Acta*, **29**, 811, 1946.
(18) Schwarzenbach (G,) und Biedermann (W.). — Komplexone IX. Titration von Metallen mit Aethylendiamintetraessigsaüre, H_4. Endpunktindication durch pH Effekte. *Helv. Chim. Acta*, **31**, 459, 1958.
(18) Schwarzenbach (G.) und Biedermann (W.). — Komplexone X. Erdalkalikomplexe von o,o'-dioxyazofarbstoffen. *Helvet. Chim. Acta*, **31**, 678, 1948.
(18) Schwarzenbach (G.) und Gysling (H.). — Metallindikatoren I. Murexid als Indicator auf Ca und andere Metall-Ionen. Komplexbildung und Lichtsabsorption. *Helvet. Chim. Acta*, **32**, 1314, 1949.
(19) Cheng (K. L.) and Bray (R. H.). — Détermination of calcium and magnesium in soil and plant material. *Soil Sci.*, **72**, 449, 1950.
(19) Hunter (J. G.). — An absorptiometric method for the determination of magnesium. *Analyst* (G. B.), **75**, 887, 91, 1950.
(19) Holtz (A. H.). — Directe titratie van calcium en magnesium in bloed serum. *Chem. Wbl. Nederl.* , **48**, 907, 1951.
(19) Banks (J.). — The volumetric determination of calcium and magnesium by the ethylenediamine-tetra-acetate method . *Analyst* (G. B.), **77**, 918, 484, 1952.

(19) Botha (G. R.) and Webb (M. M.). — The versenate method for the determination of calcium and magnesium in mineralized waters containing large concentrations of interfering ions. *Instr. Wat. Engrs. J.* (G. B.), **6**, 6, 459, 1952.

(19) Forster (W . A.). — The determination of magnesium in plantmaterial by means of ethylene diamine tetra acetic acid. *Analyst* (G. B.), **78**, 924, 179, 1952.

(19) Grette (K.). — Micromethod for the determination of calcium and magnesium in serum. Titration with ethylene-diamine-tetracetate. *Scand. J. Clin. Labo. Invest.*, **5**, 2, 151, 1953.

(19) Wilson (A. A.). — The use of ethylene diamine tetra acetate (E. D.T.A.) in the determination of calcium and magnesium in urine. *J. Comp. Pathol. Therap.*, **63**, 4, 294, 1953.

(19) Flaschka (H.). — Die Verwendung von Komplexon in der analytischen Chemie. *Oesterr. Chemiker Ztg*, **54**, 15-16, 234, 1953.

(19) Hoffman (W. W.) and Shapiro (H.). — Some observations on the versenate method for calcium and magnesium in agricultural liming materials. *J. Ass. Off. agric. Chem.* (U. S. A.), **37**, 4, 966, 1954.

(19) Gehrke (C.), Affsprung (H. E.) and Lee (Y. C). — Direct ethylenediamine tetracetate titration methods for magnesium and calcium. *Anal. Chem.* (U. S. A.), **26**, 12, 1944, 1954.

(19) Domange (L.). — Utilisation des complexons. *Ann. Falsif. Fraudes*, **581-582**, 229 et **583-584**, 269, 1957.

(19) Ashwin (P. M.) and Richtie (J. A.). — Determination of magnésium in plant ash. *New Zeal. J. Sci. Technol.*, **38**, 5, 447, 1957.

(19) Padhye (V. P.). — A rapid method for the determination of calcium and magnesium in plant material by titration with disodium ethylenediaminetetra-acetate. *Analyst* (G. B.), **82**, 634, 1957.

(20) Mazoyer (R.). — Possibilités d'emploi du versénate pour le dosage du calcium et du magnésium échangeables dans les extraits de sols. Ann. I. N. R. A. *Agron.*, **6**, 1009, 1954.

(21) Jacquin (P.) et Tavernier (J.). — Test viscosimétrique pour déterminer l'aptitude à la défécation des moûts de pommes à cidre. *Ind. Agri. Alim.*, **73**, 3, 161, 1956.

LE FER ET LE CUIVRE DANS LES POMMES ET LES POIRES ET DANS LES PRODUITS CIDRICOLES

PAR

P. JACQUIN

Station de Recherches cidricoles, Rennes

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Le rôle du fer et du cuivre dans les industries alimentaires.
- Vins et jus de fruits
- Bières
- Jus de pommes
- Sirops
- Eaux-de-vie
- Lait et produits laitiers
- Huiles
- Conserves et confitures

III. — Métaux et alliages résistant à la corrosion.
- Aluminium et ses alliages
- Alliages de nickel
- Aciers spéciaux

IV. — Le fer et le cuivre naturels de la pomme.

V. — Méthodes analytiques utilisées.
- Dosage du fer
- Dosage du cuivre
- Technique opératoire

VI. — Résultats analytiques.
- Pommes de table
- Poires à poiré
- Pommes à cidre
- Cidres d'étude de variétés séparées
- Cidres industriels
- Jus de pommes pasteurisés
- Jus de pommes concentrés
- Bières

VII. — Interprétation technologique.

VIII. — Conclusions.

IX. — Bibliographie.

I. — INTRODUCTION

Nous avons déjà abordé à plusieurs reprises l'étude du rôle néfaste d'un apport excessif de fer accidentel en cidrerie, d'abord pour éclaircir le mécanisme de l'action du fer sur le cidre dans l'accident désigné sous le nom de casse ferrique ou casse noire, puis pour étudier les diverses méthodes curatives de cet accident. (1) Nous avons pu montrer que cette casse ferrique est due à un mélange de complexes du fer ferrique avec les tannoïdes du cidre et de préférence avec les polyphénols non tanins, ainsi qu'ils ont été définis par BRUGIRARD et TAVERNIER (2). Cette casse qui n'apparaît que pour des teneurs en fer supérieures à 6 mg par litre ne peut être provoquée par le fer biologique de la pomme, elle est toujours consécutive à un enrichissement anormal en fer du moût ou du cidre au cours de la fabrication. Ce fer accidentel provient de l'attaque, par les acides naturels du moût, du fer ou des oxydes de fer des instruments et du matériel mal protégés ou mal entretenus.

Si l'attention des industriels a été depuis longtemps attirée, grâce à cet accident spectaculaire sur les dangers de laisser le cidre en contact avec des métaux ferreux au cours de sa fabrication et de sa conservation, ils ne se sont guère préoccupés jusqu'ici de l'action néfaste que pouvait jouer le cuivre sur leurs diverses fabrications. En effet, si la casse cuivreuse existe en œnologie et est redoutée dans la fabrication des vins blancs, un tel inconvénient n'a jamais été reproché au cuivre en cidrerie. L'action de ce métal peut donc être considérée comme d'autant plus néfaste qu'elle est généralement ignorée et insoupçonnée. Il n'est cependant pas rare de rencontrer dans les produits cidricoles des teneurs en cuivre atteignant plusieurs milligrammes par litre, dépassant parfois les teneurs en fer. Le cuivre est en effet utilisé fréquemment en cidrerie soit à l'état pur, soit sous forme d'alliages, dans la tuyauterie, la robinetterie, les corps de pompes, les plateaux de filtres, les centrifugeuses, etc. La nocivité du cuivre vis-à-vis du cidre et des autres produits dérivés de la pomme, repose sur la propriété que présente ce métal d'être un catalyseur d'oxydation très actif, alors que le cidre est très sensible à l'oxydation, car il possède un système oxydo-réducteur très faible, presque entièrement irréversible en pratique.

Nous pouvons donc dire que si ces métaux ne présentent aucune toxicité, aucun danger pour la santé, aux doses où ils peuvent exister dans les produits cidricoles, ils n'en constituent pas moins une source de déboires qui peuvent être très préjudiciables aux industriels si leur teneur dépasse un taux critique très faible (plus de 1 mg pour le cuivre, plus de 6 mg par litre pour le fer) ce qui se rencontre hélas trop fréquemment. Il peut alors en résulter des casses, ou la formation de troubles, de dépôts par oxydation

et précipitation partielle des matières tannoïdes, et parfois même des saveurs métalliques si la quantité de métal est trop importante.

II. — LE ROLE DU FER ET DU CUIVRE DANS LES INDUSTRIES ALIMENTAIRES

De nombreuses recherches ont été entreprises au cours de ces dernières années en vue d'élucider le rôle joué par les traces de métal dans les altérations de couleur, de saveur, de qualité des divers aliments. DESCHREIDER (3) a publié récemment une importante mise au point sur cette question à l'ordre du jour passant en revue les diverses branches des industries alimentaires où l'influence des divers métaux a été étudiée. Nous nous limitons, dans cet exposé, à rappeler les principaux travaux se rapportant aux industries des boissons et aux conserves de fruits.

Vins et jus de fruits.

LÜTHI (4), étudiant les processus d'oxydation enzymatique des jus de fruits a démontré l'importance des sels de fer et de cuivre dans ces phénomènes. Le fer et le cuivre sont des catalyseurs d'oxydation, et la réaction peut être favorisée par la vitamine C et inhibée par la vitamine B_1. D'après les études de GERO (5) sur l'action inhibitrice de divers corps vis-à-vis de l'oxydation de l'acide l-ascorbique, cet auteur confirme le rôle inhibiteur attribué ci-dessus à la vitamine B_1, et montre que l'action anticatalytique de la vitamine B_1 s'exerce du fait de la combinaison de cette vitamine avec le cuivre. L'un des deux complexes ainsi formé a été nommé « cuprothiamine ».

LÜTHI attribue également au cuivre la responsabilité de l'apparition de goût métallique dans certains jus de raisin. BENVEGNIN et coll. (6) constatèrent une altération du goût des jus de raisin lorsque le cuivre dépasse la dose de 10 mg par litre.

KOCH et BRECKER (7) analysant de nombreux jus de raisin importés par l'Allemagne s'inquiètent de la grande proportion d'échantillons renfermant en plus du fer de grandes quantités de cuivre et même de plomb.

BAUMANN (8) reconnaît qu'un long contact des moûts avec le fer provoque leur noircissement à l'air, et que le cuivre confère aux jus de fruits une saveur métallique dangereuse qui peut provoquer des nausées et même des vomissements. Cet auteur signale aussi qu'il a été constaté que, même à la dose de 2 mg par hectolitre, le cuivre peut exercer une action néfaste sur la vitamine C des jus de fruits, par son action catalytique sur les oxydases.

Par étude spectrographique des cendres, DEAN GUELBENZU (9) rencontra toujours plus de cuivre dans les vins que dans les raisins, prou-

vant ainsi un enrichissement métallique au cours de l'élaboration du vin.

Mrak et coll. (10) ont démontré que les tolérances des vins de Californie type « Chablis » et « Sauternes » vis-à-vis des métaux s'élèvent à 2 p. p. m. pour l'Al, le Cr, le Cu et le Fe, à 5 p. p. m. pour Sn et Zn, et 30 p.p.m. pour Ni.

En France, Negre et Cordonnier (11) émettent l'opinion que le fer du vin provient en partie de la matière première (4 à 7 mg au maximum de fer par litre) et en partie du matériel vinaire.

Dupuy et coll. (12) confirment la double origine du fer dans les vins, et mettent en relief l'influence de la terre qui peut souiller les grappes et apporter ainsi plus de fer que le matériel vinicole métallique.

Flanzy et Deibner (13) démontrent également l'influence importante, sinon prépondérante des particules terreuses souillant le raisin sur la dose de Fe trouvée dans les vins.

Jaulmes (14) dans son livre classique d'analyse des vins signale que les vins français ne sont généralement pas sensibles à la casse ferrique lorsque la teneur en fer est inférieure à 12-15 mg par litre pour les vins blancs et à 20-25 mg par litre pour les vins rouges, le fer n'étant d'ailleurs pas le seul facteur déterminant la casse : la nature et la quantité des acides, la présence de colloïdes ou de certains sels agissant comme inhibiteurs ou comme activeurs de la casse. Ribereau-Gayon (15) attribue également un rôle important au cuivre pour la tenue du vin : il provoque la casse cuivreuse par dépôt de sulfure de cuivre en absence d'air, et en présence d'anhydribe sulfureux, donc par réduction, alors que la casse ferrique se produit par oxydation.

Enfin, en U. R. S. S., Sapondjan et Guevorkian (16) expriment l'opinion que le fer et le cuivre peuvent modifier la constitution chimique des vins. D'après leurs études, ces métaux exercent une influence notable sur la teneur en aldéhydes, en acétals, en esters neutres, en alcool et en acides volatils, ainsi que sur l'acidité de titration et en conséquence sur les propriétés organoleptiques du vin de Xérès (de Géorgie).

Bières.

Etudiant le rôle des traces de métal dans la formation des troubles non biologiques, Bengough et Harris (17) ont trouvé que les cendres des troubles d'oxydation et des troubles au froid sont particulièrement riches en métaux lourds : cuivre, fer et aluminium, leur concentration est de 4 000 à 80 000 fois plus élevée dans les troubles que dans les bières. C'est une des raisons pour lesquelles Window et Williams (18) préconisent l'emploi de tuyauterie en pyrex dans les industries alimentaires particulièrement en brasserie.

Jus de pommes.

Récemment les chercheurs britanniques TIMBERLAKE et coll. (19) ont publié une étude approfondie sur les métaux présents dans les jus de fruits et plus particulièrement sur le rôle du cuivre dans l'apparition des troubles et dépôts constatés dans les jus de pommes au cours de la pasteurisation et de la conservation. En accord avec les conclusions de BENGOUGH et HARRIS (17) sur les bières, il leur apparaît que le cuivre peut catalyser l'oxydation et la condensation des substances phénoliques du jus de pommes, conduisant à la précipitation d'une fraction importante des polyphénols. L'acide malique jouerait un rôle inhibiteur vis-à-vis de cette condensation, tandis que le rôle du fructose et des amino-acides, bien que positif, serait beaucoup plus faible. Dans cette précipitation des matières tannoïdes, celles-ci seraient accompagnées de matières protéïques et d'une fraction importante (environ 50 p. 100) du cuivre en solution, ce métal pouvant constituer jusqu'à 10 p. 100 du poids du dépôt supposé sec. L'importance du dépôt et sa vitesse de formation sont proportionnelles à la teneur du milieu en cuivre. TIMBERLAKE résume ainsi le rôle catalytique du cuivre dans l'oxydation des polyphénols du jus de pommes : il y aurait tout d'abord formation de cuivre cuivreux et de composés phénoliques oxydés ; puis en présence d'oxygène le Cu^{+} est oxydé à nouveau en Cu^{++} qui catalyse par la suite l'oxydation et la condensation des composés phénoliques partiellement oxydés. La précipitation des polyphénols condensés (principalement du type leuco-anthocyanine) formés au cours de la conservation du jus de pommes contenant du cuivre confirmerait cette hypothèse.

Sirop.

D'après DESCHREIDER (20), l'action du cuivre est étroitement liée au pH du sirop atteint au cours de la cuisson ; à pH 2,5, il favorise le jaunissement, si la teneur en cuivre dépasse 20 p. p. m. il peut se produire un trouble rougeâtre.

TAVERNIER (21) élucida la formation accidentelle et intermittente d'une coloration ambrée, accompagnée parfois d'un léger dépôt noirâtre, observée dans certaines bouteilles de liqueur de menthe blanche. Cet accident ne se produisait que dans les fabrications de fin de semaine, le sirop de saccharose séjournant du samedi au lundi dans des bassines de cuivre. La coloration et le dépôt observés étaient dûs à du sulfure de cuivre, le cuivre provenant du récipient, le soufre, des traces d'anhydride sulfureux apporté par le sucre roux utilisé.

Eaux-de-Vie.

LAFON et COUILLAUD (22) ont signalé que des Cognacs avaient été refusés à l'étranger en raison de leur teneur trop élevée en cuivre (supérieure

à 2,5 mg). Ce cuivre provient principalement de l'alambic et sa teneur peut être encore accrue par la suite lors de la mise en bouteilles par passage de l'eau-de-vie dans les tuyauteries et les pompes. CORDONNIER et NEGRE (23) se sont également préoccupés de cette question et ont étudié les conditions d'élimination du cuivre dans les eaux-de-vie et les alcools par les phytates.

Nous avons également constaté personnellement des accidents très spectaculaires causés par des doses relativement faibles de fer (2 à 3 mg par litre) dans les eaux-de-vie de cidre déjà boisées. Le fer à ces petites doses provoque rapidement par combinaison avec le tanin du bois passé en solution, une coloration noirâtre de l'eau-de-vie, si accusée, que celle-ci est impropre à la vente dans cet état. Un collage à la colle de poisson, à la gélatine, ou au blanc d'œuf remédie parfaitement à cet accident en précipitant le tannate de fer responsable de cette altération. Par contre dans ces mêmes eaux-de-vie, des doses élevées de cuivre (de l'ordre de 20 mg au litre) ne paraissent pas produire de casse comparable à celle provoquée par le fer. D'ailleurs le collage est sans action sur le cuivre, et sans doute le traitement au phytate pourrait-il là aussi donner des résultats intéressants, car de telles doses de cuivre ne sont pas sans effet sur les qualités organoleptiques de ces produits.

TOURLIERE (24) a étudié également l'enrichissement en cuivre des produits de distillerie. Le cuivre de ces produits provient de la corrosion du métal. Cette attaque du matériel de diffusion et de distillation est favorisée par l'acidité minérale et organique et par la température. D'après cet auteur les pertes en cuivre par corrosion du matériel peuvent être chiffrées dans la pratique industrielle entre 0,01 à 0,5 g par m_2 et par jour, à froid, et peuvent s'élever de 0,5 à 5 g par m_2 et par jour à chaud.

Lait et produits laitiers.

Divers auteurs s'accordent pour rendre le cuivre responsable de la « saveur oxydée » du lait et des produits laitiers. KRUKOVSKY (25) a démontré que le cuivre est un catalyseur de cette « saveur oxydée ». Cette opinion est confirmée par PONT (26), d'après lui, il semblerait que la « saveur oxydée » produite par le cuivre dans le lait entier serait toujours accompagnée d'une formation mesurable, de peroxyde dans la matière grasse.

MULDER et coll. (27), KRUISHEER et coll. (28) ainsi que Van HAEFTEN et coll. (29) concluent que c'est le cuivre qui est responsable de la formation des peroxydes et de l'apparition des saveurs anormales dans le beurre. Ils fixent les teneurs tolérables à 0,05 mg par kilo pour le cuivre, et à 0,5 mg par kilo pour le fer, au-dessus on peut déceler une saveur métallique plus ou moins accentuée.

D'après PIRAUX et JAMOTTE (30), la présence de cuivre dans le beurre augmente la tendance au développement du goût d'huile de poisson.

Mlle Bejambes et alifax (31) ont mis au point une méthode leur permettant de doser simultanément le fer et le cuivre dans les différents produits laitiers. Pour ces produits, également, l'enrichissement en métaux se fait au cours des diverses manipulations et aux dépens du matériel métallique.

Huiles.

D'après Husaini et Saletore (32) qui étudièrent l'action des métaux sur l'huile d'arachide, ceux-ci exercent sur les huiles une action pro-oxydante. Le cuivre possède, ici aussi, une action nocive nettement plus marquée que le fer. Rams (33) préconise l'addition d'acide citrique ou d'acide phosphorique à l'huile de palme afin d'augmenter sa stabilité vis-à-vis du fer.

Conserves et confitures.

De nombreux accidents de fabrication constatés dans ce domaine ont été également reprochés à l'action nocive des métaux. Meschter (34) attribue le brunissement des confitures de fraises à la destruction des pigments anthocyaniques au cours de l'oxydation de l'acide ascorbique. Cette destruction est augmentée dans de fortes proportions par la présence de fer et de cuivre. Il importe donc ici d'assurer la stabilisation de la vitamine C et en outre d'éviter soigneusement les contaminations par des traces de cuivre et de fer.

Pour Livingston et coll. (35) le fer et le cuivre exercent un certain effet sur le brunissement des purées de pommes, de poires, conservées en bocaux de verre à 30°C pendant 28 jours.

Kitson et Strachan (36) ont fait une étude systématique de l'altération des colorants naturels et artificiels des fruits confits par l'action des traces métalliques. Ils ont reconnu que les métaux actifs dans cette altération étaient : le cuivre, le fer, l'aluminium et l'étain alors que le nickel était favorable au maintien de la coloration. Ils ont établi qu'il y a une réaction entre les ions métal et les pigments des fruits, notamment les tanins ; les cerises confites présentent parfois des taches brunes ou noirâtres constituées par des tannates de fer. Comme remède, ils préconisent l'addition de phytate de Ca à 0, 2 p. 100 qui réduit nettement l'action défavorable du fer et du cuivre. Stein et Weckel (37) travaillant sur des cerises Montmorency conservées à 0° pendant 6 mois, ont constaté que le fer avait une action défavorable plus accentuée que le cuivre. Le brunissement constaté sur les fruits est dû à la formation d'un complexe fer-tanin, ce qui avait été constaté également par Butland (38) sur des cerises destinées à la fabrication du marasquin. A partir de 10 p. p. m. le fer exerce une action prononcée sur la coloration.

Delindati (39) a démontré le rôle catalytique du cuivre dans la disparition de la vitamine C au cours de la fabrication des concentrés de tomates. Cette perte de vitamine C atteint 48 p. 100 dans du matériel en cuivre alors qu'elle est limitée à 12 p. 100 dans un appareillage en acier inoxydable.

Braun (40) a étudié le problème des contaminations métalliques des conserves par l'équipement et conclut que le matériel peut augmenter la teneur en cuivre avec comme conséquence :

— une réduction sensible de la durée de conservation des jus de pommes en boites ;

— une diminution de la teneur en acide ascorbique des jus de tomates frais ;

— une altération de la couleur des pois (pour des doses de Cu supérieures à 1 p. p. m.).

— une corrosion accélérée des récipients métalliques.

Le fer a une action moins prononcée.

Sedry et coll. (41) étudiant le brunissement de la choucroute en conserve ont reconnu que cet accident était dû à un processus oxydatif. Une contamination par le cuivre catalyserait l'oxydation de l'acide ascorbique qui exerce normalement une action protectrice sur la coloration et aurait ainsi comme conséquence d'accélérer le brunissement. Ces auteurs ont également montré que si une addition d'acide ascorbique excerce un effet protecteur en présence de fer (jusque 10 p. p. m.) elle est sans effet en présence d'une teneur en cuivre de 3 p. p. m.

Dans le même ordre d'idée l'attention a été attirée sur l'inconvénient du reverdissage des légumes fréquemment utilisé en conserverie, qui provoque la destruction de la vitamine C. Il a été également signalé par divers chercheurs (53) que le cuivre à l'état de traces, catalysait l'oxydation irréversible de l'acide ascorbique, donc la destruction de la vitamine C, et si le jus de pommes ne renferme pas des quantités de vitamine C aussi importantes que les jus de cassis ou d'agrumes, ce devrait être une raison supplémentaire de prendre toutes les précautions nécessaires afin d'en assurer la meilleure conservation.

III. — MÉTAUX ET ALLIAGES RÉSISTANTS A LA CORROSION

Nous ne poursuivrons pas plus avant cette revue des accidents d'origine métallique dans les diverses industries alimentaires. Cet aperçu succinct suffit à montrer l'importance des métaux dans les problèmes de conservation et de qualité des denrées alimentaires et à justifier tous les efforts qui ont été faits par les techniciens, soit pour étudier les nombreux problèmes de la corrosion, soit pour protéger les métaux contre cette

corrosion, ou enfin pour rechercher des métaux ou autres matériaux qui résistent le mieux à l'usure ou à la dissolution par les constituants acides des produits traités.

Certains alliages ou métaux ont fait l'objet d'études poussées en vue de leur emploi dans les diverses branches de l'industrie alimentaire. En cidrerie, WARCOLLIER et TAVERNIER (44) ont effectué plusieurs travaux :

— sur les accidents de fabrication causés en industrie cidricole par les métaux, le matériel en ciment ;

— sur l'emploi de métal-monel en cidrerie (alliage naturel de 67 p. 100 de Ni, 28 p. 100 de Cu et 5 p. 100 de l'ensemble Fe, Mn, Si, C, S) qui se révèle être attaqué sérieusement par le cidre en cas de contact prolongé ;

— sur les aciers spéciaux : Uranus 10 (à 20 p. 100 de chrome et 8 p. 100 de nickel) et A. R. C. 2 702 (à base de fer, nickel, chrome) qui montrent une bonne résistance aux cidres et aux agents chimiques et peuvent être utilisés en cidrerie.

— sur l'aluminium à 98-99 p. 100 ,à 99,5 p. 100, à 99,9 p. 100, puis sur des alliages d'aluminium : aluminium-manganèse et almasilium ; il résulte de ces essais que ces différents matériaux sont légèrement attaqués par le cidre, l'attaque augmente avec l'acidité et surtout avec la teneur du cidre en SO_2. En cas de contact prolongé avec le cidre, il serait nécessaire de protéger le métal par un enduit.

— sur l'inconel (composition approximative : 80 p. 100 de nickel, 14 p. 100 de chrome et 6 p. 100 de fer) ; cet alliage résiste moins bien que l'aluminium et ses alliages à l'acide sulfureux, mais résiste mieux à l'action des acides malique et acétique.

PATRON (45) a également expérimenté la résistance des aciers inoxydables à la corrosion par les jus de fruits et sirops de fruits.

Enfin, tout récemment KOCH et BREKER (46) ont étudié l'influence des tanks et des boîtes en aluminium sans revêtement intérieur sur la qualité des jus de fruits qui y sont conservés. Ils concluent de leurs expériences que des quantités assez importantes d'aluminium, — et de manganèse —, dans le cas d'alliage, peuvent passer en solution dans les jus et leur conférer une saveur métallique prononcée ; les boîtes bombent après un mois de conservation pour le jus de raisin, après 4 mois pour le jus de pommes. Lorsque le jus est sulfité, il se dégage également de l'hydrogène sulfuré qui rend le jus inconsommable. La corrosion est d'autant plus prononcée que l'acidité des jus est plus élevée, la conservation plus longue, et le récipient plus petit, c'est-à-dire le rapport surface/volume plus faible. La corrosion dépend également des caractéristiques du métal, la tôle d'aluminium étirée est plus fortement attaquée que la tôle laminée. Dans les tanks en aluminium pur (99,6 p. 100) la corrosion atteint 50 mg par m_2 par mois et par gramme d'acidité au litre du jus stocké. Ces

auteurs recommandent donc de munir les tanks d'aluminium d'un revêtement en cas de conservation de longue durée, afin d'éviter un enrichissement trop important des jus conservés en aluminium et surtout en manganèse, plus nocif à la santé, un jus de fruit à trop haute teneur en aluminium et manganèse ne méritant plus la qualification « pur naturel ».

IV. — LE FER ET LE CUIVRE NATURELS DE LA POMME

Dans notre première étude sur la casse ferrique des cidres (1) effectuée avec TAVERNIER, nous avons trouvé dans un moût de pommes brassé en absence de fer une dose de 0,8 mg de fer total par litre et en avions déduit que la teneur normale des moûts de pommes était de l'ordre de 1 mg de fer par litre. Il existe, dans la littérature, peu de références sur la teneur des pommes en fer et en cuivre.

BROWN (47) dosant le fer sur la pomme anglaise « Lanes Prince Albert » signale une teneur de 0,0046 p. 1 000 de la matière fraîche exprimée en Fe_2O_3 soit donc 3,2 mg par kg en Fe.

SHERMAN (48) indique dans ses tables de composition des aliments, des teneurs en fer de 0,003 p. 1 000 et en cuivre de 0,00071 p. 1 000 dans la partie comestible de la pomme.

TIMBERLAKE (59) travaillant sur 9 pommes à cuire ou de dessert et sur 8 pommes à cidre donne pour leur teneur en fer et en cuivre les chiffres suivants :

— pour les pommes à cuire et de dessert, exprimés en milligrammes par kg de matière fraîche :

fer de 1,0 à 2,5 mg ; moyenne 1,7 mg.

cuivre de 0,34 à 0,59 mg ; moyenne 0,45 mg ;

— pour les pommes à cidre : en mg par kg de matière fraîche, ou en mg par litre :

dans les pommes :

fer de 1,3 à 2,5 mg ; moyenne 1,9 mg ;

cuivre de 0,27 à 0,52 mg, moyenne 0,36 mg ;

dans le jus :

fer de 0,7 à 2,8 mg, moyenne 1,52 mg ;

cuivre de 0,45 à 1,15 mg, moyenne 0,81 mg ;

dans les cidres : fer de 0,4 à 3,5 mg, moyenne 1,7 mg ;

cuivre de 0,26 à 0,88 mg, moyenne 0,46 mg.

Ces chiffres prouvent un léger enrichissement en métaux au cours du broyage et du pressurage du fruit puisque les jus sont notablement plus riches en cuivre que les fruits, la dose de ce métal baisse dans le cidre fermenté, le fer lui aussi augmente légèrement au cours de la fabrication.

En France, GUERITHAULT (50), dans sa thèse sur le cuivre chez les végétaux et dans l'organisme-humain, avance la dose de 0,001 p. 100 de cuivre dans la matière fraîche de la pomme.

JAVILLIER (51) cite, dans son livre, les chiffres suivants pour le fer et le cuivre dans la pomme et la poire : D'après H. NAKAMURA du laboratoire de G. BERTRAND (page 54), pour la pomme : 0,5 p. 100 de fer dans la matière sèche et pour la poire : 1,7 p. 100 de fer dans la matière sèche ce qui correspondrait approximativement dans la matière fraîche à 0,8 mg par Kg pour la pomme et à 2,8 mg pour la poire. D'après différents auteurs (p. 64) les pommes renfermeraient 0,74 mg de cuivre pour 100 g de matière sèche, soit 1,2 mg par kg de matière fraîche, et les poires : 1,29 mg de cuivre pour 100 g de matière sèche, soit 2,2 mg de cuivre par kg de matière fraiche. Ces derniers chiffres de cuivre sont nettement plus élevés que ceux indiqués par les auteurs anglo-saxons. LAVOLLAY et ses collaborateurs (52) fixent les teneurs des pommes et des poires comme suit : pour la pomme : de 0,3 à 0,5 mg de fer et 0,1 mg de cuivre par 100 g ; pour la poire : 0,4 mg de fer et 0,1 mg de cuivre pour 100 grammes.

LEDERER (53) indique des doses semblables pour le fer, soit 0,4 mg pour 100 g dans la poire et 0,3 mg pour 100 g dans la pomme. On peut cependant conclure de ces données que le fer et le cuivre sont des métaux existant normalement dans la pomme et la poire. JAVILLIER (p. 64) énonce d'ailleurs « La présence du cuivre chez les végétaux est un fait constant. Il y en a dans toutes les parties des plantes. Le cuivre, qui dès ce moment apparaît comme un élément essentiel et migrateur, se porte là où l'activité vitale est la plus grande, dans les bourgeons, les jeunes feuilles; à la maturation il se dirige vers les fruits, s'accumule dans les graines, et électivement dans le germe ». Quant au fer, sa présence a été prouvée depuis longtemps dans les végétaux, d'après JAVILLIER, ce serait Nicolas LEMERY médecin et chimiste français (1645-1715) et son fils Louis qui, les premiers, auraient considéré le fer comme un élément normal des végétaux, qui « monte de la terre dans les plantes sous forme de vitriol ».

Le rôle indispensable du fer et du cuivre est suffisamment démontré en biologie végétale ne serait-ce que par leur intervention dans les processus d'oxydation ; il nous paraît donc inutile de nous attarder sur cette question.

V. — MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

Le but de notre travail était d'établir avec certitude les doses de fer et de cuivre normales des pommes, dans quelles limites elles pouvaient varier, dans quelles proportions ces métaux passaient du fruit dans le jus et enfin comment le cidre s'enrichissait, se contaminait en traces métalliques au cours de sa fabrication.

Ce ne sont pas les méthodes fines d'analyse qui font actuellement défaut au chimiste pour caractériser et doser de très petites quantités de fer et de cuivre. La difficulté réside plutôt dans toutes les précautions qu'il lui faudra prendre pour se mettre à l'abri, dans son laboratoire, d'un apport intempestif de ces éléments, car ses analyses n'auront toutes leurs valeurs que si le maximum a été fait pour éviter toute contamination métallique accidentelle des matériaux à analyser.

Dosage du Fer.

Il existe une telle multitude de méthodes de dosage de ce métal : volumétriques, gravimétriques, colorimétriques, spectrographiques, soit sous sa forme Fe^{+++}, soit sous sa forme Fe^{++} que la seule énumération de ces méthodes et de leurs variantes dépasse le cadre de ce travail. Une étude récente vient d'ailleurs d'en être faite en France par ROBICHET (54) et nous ne pouvons qu'y renvoyer les lecteurs spécialement intéressés par cette vaste question.

Nous nous contenterons d'indiquer les méthodes de dosage du fer utilisées le plus couramment en technologie.

TIMBERLAKE (49) dans son étude des métaux présents dans la pomme utilisa pour le dosage du fer la méthode à l'o-phénanthroline à pH 3,5 d'après BANDEMER et SCHAIBLE (55).

CORDONNIER (11) dose le fer dans les vins par la méthode colorimétrique classique au sulfocyanure, mise au point pour les vins blancs et rouges par RIBEREAU-GAYON (56).

DEIBNER après avoir étudié le dosage iodométrique du fer (57) applique dans ses recherches la méthode colorimétrique à l'o-phénanthroline (58). DUPUY et coll. (12) ont utilisé dans leurs recherches sur l'origine du fer dans les vins, la méthode colorimétrique au thiocyanate.

Dans leurs dosages simultanés du fer et du cuivre dans le lait et les produits laitiers, ALIFAX et BEJAMBES (31) emploient la méthode de VENTURA et WHITE (59) où le fer est dosé à l'électrophotomètre à l'état de complexe ferreux avec le 2-2'dipyridyl.

Enfin dans nos travaux précédents sur la casse ferrique des cidres (1) noux avions utilisé la méthode au thiocyanate de potassium avec extraction du complexe coloré à l'éther sulfurique, le fer étant oxydé à l'état ferrique par le métavanadate d'ammonium.

Pour ces nouvelles recherches, nous avons donné la préférence à la méthode photocolorimétrique à l'o-phénanthroline en appliquant le mode opératoire mis au point par DEIBNER et BOUZIGUES (58). La méthode photocolorimétrique à l'o-phénanthroline a également été employée par BRETTHAUER pour doser le fer dans les différents jus de fruits en utilisant la technique décrite par BENCZE (61). BRETTHAUER dose le fer soit sur

les cendres des jus, soit directement sur le jus lui-même. Avec les jus de pommes, et les cidres, la coloration originelle nous a gênés, de plus une partie du fer complexé échappe au dosage.

Il est donc préférable d'employer la technique détaillée par DEIBNER et BOUZIGUES (58) avec hydrolyse des cendres à l'acide chlorhydrique concentré pour faciliter la dissolution des oxydes de fer et surtout la transformation du pyrophosphate insoluble en orthophosphate afin d'éviter les pertes de fer.

Dosage du cuivre.

Il existe plusieurs réactions colorées susceptibles d'être utilisées à un dosage colorimétrique du cuivre aux faibles doses où il existe dans les denrées alimentaires et les boissons : coloration bleue à l'ammoniaque, jaune avec le diéthyldithiocarbamate (62) et avec la dithizone (63), rouge avec le 2,2 diquinolyle.

La brochure des méthodes de prélèvement et d'analyse publiée par le Comité d'Organisation de la production des jus de fruits et de légumes préconise pour le dosage du cuivre la méthode au diéthyldithiocarbamate de CALLAN et HENDERSON (62). Ce réactif a également été utilisé par TIMBERLAKE (49), en extrayant le colorant au tétrachlorure de carbone et également par ALIFAX et BEJAMBES (31) avec extraction du colorant par un mélange à volume égal d'alcool amylique et d'alcool éthylique. PEYNAUD (64) dose le cuivre dans les vins au 2-2 diquinolyle. L'emploi du 2-2 diquinolyle a été étudié par BRECKENRIDGE et coll. (65) qui ont montré que ce réactif donnait avec les ions cuivreux une coloration pourpre très stable. Cette réaction très sensible est spécifique du cuivre. HOSTE (66) a éprouvé la sensibilité et la spécificité de la réaction. Il a essayé 55 ions différents qui, même en proportion de 10 000 pour 1 de cuivre, n'interfèrent pas. Cet auteur a proposé l'emploi du réactif en solution dans l'alcool amylique et à un pH supérieur à 3,0. Le dosage colorimétrique du cuivre au 2-2 diquinolyle serait 10 fois plus sensible qu'avec le diéthyldithiocarbamate et 4 fois plus sensible qu'à la dithizone, et bien plus spécifique.

Cette méthode de dosage après avoir été appliquée aux sols et aux végétaux (67) a été introduite en analyse des boissons par PEYNAUD (64) qui a étudié la réduction des ions cuivriques en ions cuivreux par le chlorhydrate d'hydroxylamine et le chlorhydrate de cystéine. Il applique la méthode directement aux vins blancs avec la cystéine, et aux vins blancs ou rouges avec l'hydroxylamine.

Récemment RILEY et SINHASENI (68) ont proposé l'emploi du 2-2' diquinolyle en solution dans l'alcool hexylique pour l'extraction et le dosage du cuivre dans l'eau de mer ; l'alcool hexylique étant beaucoup moins soluble dans l'eau que l'alcool isoamylique, les auteurs augmentent

ainsi la précision du dosage spectrophotométrique qu'ils effectuent à 540 mμ. Ils ont également appliqué leur technique au dosage du cuivre dans les roches et en analyse biologique.

Enfin, nous ne mentionnerons que pour mémoire la polarographie qui a été également appliquée au dosage du cuivre dans les boissons sucrées ou fermentées (69). Ce procédé nécessitant un appareillage coûteux n'est pas à notre portée.

La méthode au 2-2'diquinolyle s'étant révélée très sensible et d'un emploi facile, c'est elle que nous avons utilisée mais, après minéralisation de l'échantillon, afin d'obtenir le cuivre total, d'une part, et d'autre part parce que le cidre laisse passer une partie de ses matières colorantes dans l'alcool amylique, ce qui perturbe le dosage colorimétrique.

Technique opératoire.

a) Minéralisation.

Nous avons effectué des dosages de fer et de cuivre soit sur des pommes et des poires, soit sur des jus et des cidres. Dans le cas des liquides, 50 cc. mesurés à la pipette de précision sont introduits dans une capsule de platine et évaporés au bain-marie bouillant. L'extrait sirupeux obtenu est desséché à l'étuve portée d'abord à 100-110° puis graduellement jusqu'à 200-220° où la masse commence à charbonner. Lorsque les dosages portent sur des fruits, nous avons prélevé, en nous servant d'un couteau en acier inoxydable, un segment sur un nombre de fruits variant de 10 à 25 selon leur grosseur, et de façon à obtenir un poids de matière fraîche compris entre 50 et 55 g. Ces fines tranches représentant un bon échantillonnage moyen étaient introduites dans une capsule de platine. La capsule était alors portée à l'étuve à 100° et la dessication poursuivie comme pour les jus. Après dessication, les capsules sont soumises à la calcination dans un four électrique à moufle de silice, à une température ne dépassant pas 500°. On reprend alors, à l'eau bidistillée dans le verre, le résidu de la calcination comportant encore des particules de charbon, on recueille le filtrat, puis on reporte au moufle la capsule ayant reçu le filtre séché, et on poursuit la calcination jusqu'à l'obtention de cendres blanches. On réincorpore alors le filtrat dans la capsule, et on évapore à sec au bain-marie bouillant. Les cendres sont alors reprises, selon la technique DEIBNER, avec 5 cc d'acide chlorhydrique à 16° Bé (25 p. 100 d'HCl en poids), et on laisse digérer à froid pendant 30 minutes, afin de faciliter la dissolution des oxydes et des phosphates métalliques. Puis on reporte au bain-marie jusqu'à sec. Le résidu sec est alors repris à l'eau acidulée de 2 cc. de HCl concentré, puis transvasé dans une fiole jaugée de 50 cc. C'est sur cette liqueur que sont effectués les dosages du fer et du cuivre.

b) **Dosage du fer.**

Réactifs nécessaires : (sont préparés avec de l'eau bidistillée dans le verre).

Eau bidistillée dans un appareil de verre Pyrex.

Acide chlorhydrique pur R. P. à 10 p. 100.

Solution d'hydroquinone à 2,5 p. 100 dans de l'eau acidulée par 2 cc d'acide sulfurique concentré pour 100 cc. A conserver dans un flacon de verre foncé au frigidaire.

Solution de sulfate de sodium anhydre à 20 p. 100.

Solution d'orthophénanthroline à 0, 5 p. 100 dans l'alcool à 96° G. L.

Solution d'acétate d'ammonium R. P. à 20 p. 100.

Selon la teneur présumée en fer, 10 ou 20 cc de la liqueur préparée comme indiqué ci-dessus sont prélevés à la pipette de précision et introduits dans une fiole jaugée de 50 cc ; on ajoute alors dans la fiole 6 ou 2 cc de HCl à 10 p. 100 selon que l'on est parti de 10 ou de 20 cc, puis successivement : 2 cc de la solution d'hydroquinone, 2 cc de la solution de sulfite de soude et 1 cc de la solution alcoolique d'o-phénanthroline. Puis après agitation on abandonne au repos pendant 1/4 d'heure, temps suffisant à la réduction. On ajoute alors à la fiole 10 cc de la solution d'acétate d'ammonium. La fiole se colore immédiatement à une intensité proportionnelle à la dose de fer. On complète à 50 cc avec de l'eau bidistillée, et on peut pratiquer immédiatement la mesure colorimétrique. La coloration étant très stable, on peut d'ailleurs différer, si besoin est, le passage au photocolorimètre. L'appareil est étalonné à l'aide d'une gamme de fioles de 50 cc préparées comme précédemment en partant d'une solution étalon de fer (0,0863 g d'alun de fer et d'ammonium R. P. dissous dans une fiole jaugée de 1 000 cc et additionné de 10 cc d'HCl N/1, compléter à 1 000 avec de l'eau bidistillée) dont 10 cc correspondent à 0,1 mg de Fe. On établit ainsi une gamme de 50, 100, 150, 200 et 250γ de Fe dans 50 cc. La coloration suit la loi de LAMBERT-BEER, et on reporte les indications du photocolorimètre muni d'un filtre à 500 mμ —(le maximum d'absorption se situe à 508 m μ (54) — sur un graphique établi en portant en abcisses les unités optiques et en ordonnées les doses de fer en γ pour 50 cc.

D'après les densités optiques obtenues avec les solutions à analyser et reportées sur le graphique, on déduit la teneur en fer en γ dans les 50 cc puis par un calcul simple, on reporte au litre ou au kg en évaluant alors la teneur en fer en mg par litre ou par kg de l'échantillon considéré.

c) **Dosage du cuivre.**

Comme pour le dosage du fer, on n'utilise que de l'eau bidistillée dans le verre.

Réactifs nécessaires :

Solution de NaOH N/1.

Solution d'acétate de sodium R. P. à 50 p. 100.

Solution à 0,02 p. 100 de 2,2-diquinolyle dans l'alcool isoamylique

Chlorhydrate d'hydroxylamine pur.

On commence par doser sur 5 cc l'acidité de la liqueur de digestion des cendres, avec la soude N/1 en présence de 1 goutte de phénolphtaléine. Puis on introduit 10 cc de cette liqueur mesurée à la pipette de précision dans un tube à essai de 200/20 m/m bouché à l'émeri ; on y ajoute un volume de soude N/1 équivalent à sa neutralisation diminué de 0,2 cc, puis on l'additionne de 2cc de la solution d'acétate de sodium, et d'une quantité de chlorhydrate d'hydroxylamine de l'ordre de 0,5 g ; on homogénise, et introduit à la pipette exactement 5 cc de la solution amylique de 2,2-diquinolyle. On bouche le tube et agite violemment pendant 2 minutes On abandonne au repos pendant deux heures afin d'assurer une bonne séparation des deux couches aqueuse et amylique. Cette séparation peut être accélérée et parfaite par centrifugation. Ensuite on prélève à la pipette la couche amylique colorée que l'on examine à l'électrophotomètre. Le maximum d'absorption se situe à 540 mμ d'après COPPENET et coll. (67).

On établit une gamme étalon en préparant des tubes traités comme ci-dessus et contenant des doses progressives de cuivre de 0 à 50 γ. En portant les résultats sur un graphique (abcisses : déviation de l'électrophotomètre, ordonnées : Cu en γ) on obtient une droite.

D'après le résultat colorimétrique obtenu avec l'échantillon à analyser et reporté sur le graphique, on en tire la teneur en de cuivre dans les 10 cc et on reporte cette valeur au litre ou au kg de la matière première originelle.

D'après PEYNAUD, en utilisant un excès d'hydroxylamine (0,5 g) on est certain que la réduction du Cu^{II} en C^{I} est complète, et la réaction de la 2-2 diquinolyle est également indépendante du pH dans une large zône (pH 3,0 à 7,0). C'est pourquoi nous ne nous sommes pas astreints à vérifier et ajuster le pH de chaque tube à 4,5 comme le font COPPENET et coll.

VI. — RÉSULTATS ANALYTIQUES

Afin d'avoir des données statistiques précises sur les teneurs normales en fer et en cuivre des pommes et des produits cidricoles, nous avons procédé au dosage de ces métaux dans de nombreux échantillons, désignés ci-dessous :

— dans la pulpe et le jus de 15 variétés de pommes de table provenant d'un verger de collection de l'Ecole Nationale d'Agriculture de Rennes ;

— dans la pulpe et le jus de 12 variétés de poires à poiré provenant également d'un verger de collection de fruits à cidre de l'E. N. A.

— dans la pulpe et le jus de 20 variétés de pommes à cidre d'origines diverses ;

— dans 115 échantillons de cidres pur jus de variétés séparées, brassés par nos soins et dont les pommes sont d'origines diverses ;

— dans 60 échantillons de cidres industriels fabriqués dans les principales cidreries de la région Ouest, plus un cidre belge ;

— dans 7 échantillons de jus de pommes pasteurisés industriels.

— dans 18 échantillons de jus de pommes concentrés à 38° Bé environ fabriqués dans les usines spécialisées de la région.

— dans 10 échantillons de bières fabriquées dans l'Ouest.

Pommes de table.

Ces fruits ont été cueillis par nous à leur époque de maturité de cueillette. Le verger étant soumis à de nombreuses pulvérisations de produits anticryptogamiques divers au cours de la végétation, les fruits ont d'abord été lavés soigneusement à l'eau chlorhydrique, puis à l'eau distillée afin de les nettoyer complètement et d'éliminer toute trace des pesticides qui pouvaient les souiller à la récolte. L'analyse de la pulpe est effectuée sur des tranches prélevées sur les fruits comme il a été dit précédemment. Puis les fruits sont alors passés à la râpe mécanique, et la râpure recueillie dans un plat en aluminium, aussitôt pressée dans une presse de laboratoire afin d'en extraire le jus. Les différentes parties de la presse étaient soigneusement enduites d'un vernis pour préserver le métal du contact des jus, et éviter ainsi un enrichissement accidentel de ceux-ci en métaux, ce qui aurait faussé totalement les conclusions normales. Le tableau I rassemble les résultats analytiques ainsi obtenus. De leur examen on peut en déduire que la pulpe qui n'a été en contact qu'avec la lame d'acier inoxydable du couteau contient réellement des quantités de fer normal qui ne sont pas négligeables, puisque pour les 15 variétés analysées, nous constatons des doses allant de 1,42 mg à 4,10 mg par kg de matière fraîche. De même pour le cuivre, les teneurs de la pulpe varient selon les variétés de 0,637 mg à 1,125 mg par kg de matière fraîche. Pour ces quinze variétés les teneurs moyennes sont respectivement : 2,32 mg de fer et 0,829 mg de cuivre par kg de matière fraîche.

Le jus de pression de ces pommes est obtenu, rappelons-le, par pression de la râpure donnée par une râpe dont les lames sont en acier ordinaire. Il est donc logique de craindre, au cours de cette opération, un enrichissement de la matière première en fer, le jus de pommes et de poires étant d'autant plus agressif qu'il est plus acide, ce qui est le cas pour ces variétés de pommes. Or les jus analysés montrent des teneurs

en fer relativement faibles, allant de 0,50 à 2,0 mg par litre avec une moyenne de 1,03 mg par litre. On peut donc admettre que dans les conditions de travail réalisées, matériel propre, sans trace de rouille, l'apport de fer par la râpe peut être négligé. Le pressoir, dont les parties métalliques entrant en contact avec la pulpe ou le jus sont soigneusement vernies et vérifiées avant chaque opération d'extraction ne peut constituer une source d'enrichissement du jus en fer.

TABLEAU I

Le fer et le cuivre dans les pommes de table

	Dans la pulpe en mg par kg		Dans le jus			
					En mg par litre	
	Fer en Fe	Cuivre en Cu	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en Fe	Cuivre en Cu
Boria	4,10	0,780	1041,5	5,24	0,50	0,424
Brettacher	1,88	0,696	1052,0	6,42	0,75	0,362
Canada d'Auvergne	1,90	0,982	1064,0	7,55	1,54	0,485
Gano	1,72	0,773	1050,0	3,33	2,00	0,316
Gewurluiken	2,15	0,678	1047,0	4,85	1,52	0,362
Golden Delicious	2,34	0,637	1064,5	3,53	1,55	0,350
Jonathan	2,59	0,732	1057,0	5,30	1,25	0,215
King David	2,38	0,821	1048,5	6,62	0,78	0,260
Reinette d'Armorique	2,15	0,643	1047,0	4,95	1,05	0,282
Reinette de Caux	2,58	0,763	1043,0	3,67	0,50	0,373
Reinette grise de Vitry	1,96	1,044	1054,0	7,45	0,85	0,767
Reinette de Maurs (Cantal)	1,42	0,978	1044,0	3,10	0,45	0,373
Reinette de Saintonge	3,22	0,773	1044,0	6,27	0,80	0,426
Staymann Winesap	2,32	1,125	1051,5	3,62	0,88	0,452
Starking Delicious	2,03	1,010	1056,0	2,08	0,95	0,316
Maximum	4,10	1,125	1064,5	7,55	2,00	0,767
Minimum	1,42	0,637	1041,5	2,08	0,50	0,215
Moyenne	2,32	0,829	1050,9	4,93	1,03	0,384

La teneur des jus en cuivre varie de 0,215 à 0,767 mg par litre avec une moyenne de 0,384 mg par litre. Au cours des opérations de râpage et de pressurage, il n'y a aucune possibilité de contamination, la matière première ne se trouvant jamais en contact avec du cuivre.

Nous noterons simplement que les jus renferment en moyenne à peine 50 p. 100 du fer et du cuivre normal de la pomme. Remarquons également que par rapport aux résultats se rapportant aux pommes à cidre (tableau III), les quinze variétés de pommes de table analysées présentent des doses de cuivre nettement plus élevées ; cette constatation s'affirme tant pour la pulpe que pour le jus. Si les teneurs moyennes en cuivre sont, pour les pommes de table de 0,829 mg par kg de pulpe et 0,384 mg par litre de jus, elles tombent à 0,625 mg par kg de pulpe et 0,208 mg par litre de jus pour les pommes à cidre, ce qui représente en pourcentage des écarts de 25 p. 100 pour la pulpe et de 45 p. 100 pour le

jus. Les pommes de table sont donc nettement plus riches en cuivre que les pommes à cidre. Cette différence peut s'expliquer simplement, croyons-nous, par le fait que les pommiers à cidre ne sont généralement pas traités aux anticryptogamiques, alors que les pommiers à couteau nous ayant fourni les pommes de table en question sont régulièrement soumis à de nombreux traitements pesticides dont un au moins à la bouillie bordelaise. Ces arbres sont donc, de ce fait, plus riches en cuivre que ceux qui ne sont jamais soumis à de tels traitements, le métal passant dans les tissus et la sève, soit par la terre et les racines, soit directement par les feuilles. Puis il a tendance à s'accumuler dans les fruits ainsi que l'a rapporté JAVILLIER (51).

Poires à poiré.

Les investigations portant sur ces fruits ont été effectuées exactement comme il a été expliqué ci-dessus pour les pommes à couteau. Les teneurs de la pulpe en fer et en cuivre rassemblées dans le tableau II représentent donc bien le fer et le cuivre existant normalement dans le fruit. Quant au jus, on peut évidemment redouter un léger enrichissement en fer au contat des dents de la râpe, la corrosion étant encore plus à craindre avec les poires à poiré souvent riches en acide citrique (70), qui est réputé encore plus agressif pour les métaux que l'acide malique. Cependant, les résultats dans leur ensemble restent comparables à ceux obtenus dans le chapitre précédent pour les pommes de table, et si contamination métallique il y a eu, elle peut pratiquement être négligée.

TABLEAU II

Le fer et le cuivre dans les poires à poiré.

	Dans la pulpe en mg par kg		Dans le jus			
					En mg par litre	
	Fer en Fe	Cuivre en Cu	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en Fe	Cuivre en Cu
Carisi	3,00	0,581	1035,5	2,65	1,60	0,237
Coignet	3,55	0,756	1065,0	7,75	1,90	0,350
Deniacre	2,62	0,738	1058,0	4,75	1,55	0,563
Fausset	3,48	0,865	1056,0	5,50	1,80	0,350
Graneville	3,15	0,887	1070,0	6,07	2,65	0,384
Gros Blot	2,64	0,960	1054,5	7,80	1,50	0,518
Muscadet	2,28	0,836	1062,0	7,20	1,35	0,260
Navet	2,24	1,558	1061,0	2,55	2,00	0,384
Petit Roux	3,04	1,093	1066,0	3,18	2,20	0,768
Plant de Blanc	2,50	1,470	1067,0	5,88	1,00	0,396
Rousset	2,95	1,038	1051,0	5,78	1,80	0,362
Souris	2,78	0,726	1052,5	2,90	2,40	0,260
Maximum	3,55	1,558	1070,0	7,80	2,65	0,768
Minimum	2,24	0,581	1035,5	2,55	1,00	0,237
Moyenne	2,85	0,959	1058,2	5,17	1,81	0,403

Le tableau II nous montre donc que les poires à poiré sont légèrement plus riches en fer et en cuivre que les pommes, les fluctuations des teneurs de la pulpe étant plus importantes pour le cuivre que pour le fer. Pour ces fruits, la teneur moyenne de la pulpe en cuivre approche 1 mg par kg, mais dans ce cas on ne peut expliquer cette teneur par les traitements antiparasitaires, car ces arbres n'en reçoivent pas. Si les poires à poiré se montrent un peu plus riches en fer et en cuivre que les pommes (ainsi d'ailleurs qu'elles sont plus riches en magnésium) (71) cela peut être expliqué comme étant un caractère spécifique du poirier. On peut d'ailleurs remarquer qu'en général les poiriers à poiré présentent une charpente, un développement beaucoup plus important que les pommiers, surtout que les variétés à couteau, ce qui doit correspondre logiquement à un développement également plus important du système radiculaire ; les racines du poirier explorent donc un volume de terre plus important, ce qui pourrait expliquer qu'elles puissent en extraire plus d'éléments qui vont s'accumuler dans les fruits.

TABLEAU III

Le fer et le cuivre dans les pommes à cidre.

	Dans la pulpe en mg par kg		Dans le jus			
					En mg par litre	
	Fer en Fe	Cuivre en Cu	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en Fe	Cuivre en Cu
Beda (Manche)	2,24	0,700	1051,2	2,00	1,40	0,170
Charge Souvent (Manche)	4,72	0,732	1045,0	1,27	1,45	0,170
Cimetière (Manche)	4,30	0,644	1057,2	1,71	1,40	0,158
Cœur Dur (Manche)	5,20	0,522	1046,8	1,22	2,30	0,124
Doux Amer (Manche)	3,70	0,524	1050,1	1,86	1,35	0,215
Équerquille (Manche)	3,10	0,537	1045,6	1,02	1,35	0,327
Feuillard (Manche)	3,97	0,723	1046,6	1,76	1,17	0,203
Marin Onfroy (Manche)	6,18	0,436	1053,0	2,49	1,75	0,181
Taureau (Manche)	3,82	0,713	1050,1	2,25	1,15	0,215
Tête de Brebis (Manche)	2,57	0,744	1055,7	1,56	1,25	0,204
Quatre Bières amer (Manche)	2,86	0,646	1047,0	1,03	1,30	0,204
Quatre Bières doux (Manche)	3,02	0,696	1050,0	1,37	1,30	0,248
Chuero Rous (Finistère)	5,83	0,574	1055,4	1,32	1,60	0,158
Doux Evêque Briz (Finistère)	4,74	0,805	1062,9	1,22	1,40	0,350
Dous Rous Bihan (Finistère)	2,52	0,552	1050,2	2,10	1,05	0,205
Doux au Lièvre (I.-et-V.)	4,52	0,505	1038,0	0,93	1,60	0,147
Doux au Prince (I.-et-V.)	5,71	0,376	1044,5	2,00	1,70	0,158
Rouge (I.-et-V.)	4,30	0,843	1048,2	1,71	2,05	0,270
Martinais (Morbihan)	5,77	0,606	1049,5	1,61	1,40	0,293
Petit Gars (C.-du-N.)	2,90	0,630	1049,0	1,22	2,35	0,170
Maximum	6,18	0,843	1062,9	2,49	2,35	0,350
Minimum	2,24	0,376	1038,0	0,93	1,05	0,124
Moyenne	4,10	0,625	1049,8	1,58	1,516	0,208

Comme pour les pommes, on constate que le jus des poires est nettement moins riche en fer et en cuivre que la pulpe. Le râpage des fruits ne paraît pas enrichir d'une façon sensible les jus en fer puisque leur teneur

varie de 1 à 2,65 mg par litre avec une dose moyenne de 1,81 mg par litre. De même le cuivre varie dans les jus de 0,237 à 0,768 mg avec une moyenne de 0,403 mg par litre. Les quantités de fer et de cuivre qui passent de la pulpe dans le jus au cours du pressurage sont donc de l'ordre de 60 p. 100 pour le fer et de 40 p. 100 pour le cuivre.

Pommes à cidre.

Pour cette catégorie de fruits, les conditions de travail ne nous ont pas permis de procéder exactement de la même façon que pour les fruits précédents. Nos analyses sont effectuées dans ce dernier cas sur vingt variétés de pommes à cidre qui nous ont été envoyées de plusieurs départements de l'Ouest, par lots d'une cinquantaine de kg en vue de leur étude technologique. Nous avons alors été obligés de renoncer à faire l'analyse de la pulpe sur des segments prélevés sur les fruits, et nous avons pratiqué cette analyse sur un échantillon moyen de la râpure de chaque lot de fruits prélevé avant le passage à la presse.

Le tableau III rassemble les résultats ainsi obtenus.

La première constatation que nous pouvons faire est que la pulpe de ces fruits présente, comparativement aux données fournies par les pommes à couteau et les poires à poiré, une teneur en fer nettement plus élevée puisqu'elle varie de 2,24 à 6,18 mg par kilo avec une moyenne de 4,10 mg contre une moyenne de 2,32 mg par kilo pour les pommes à couteau (minimum 1,42 mg, maximum 4,10 mg par kilo) et 2,85 mg par kilo pour les poires à poiré (minimum : 2,24 mg, maximum : 3,55 mg par kilo). Nous avons pensé aussitôt expliquer cette différence, qui nous paraissait anormale, par une contamination de la pulpe par le fer de la râpe. Nous avons alors vérifié la justesse de cette hypothèse en procédant à l'analyse comparative de la pulpe prélevée directement sur la pomme, et de la pulpe obtenue par râpage. Nous avons répété cette vérification sur trois variétés de pommes aigres afin d'accroître les chances de corrosion de la râpe. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV, l'analyse de la râpure a été faite sur deux échantillons pour remédier autant que possible à la difficulté de prélèvement d'un échantillon moyen sur une quantité de râpure de l'ordre de 50 kilos.

Les teneurs en fer de la pulpe nature apparaissent normales par comparaison avec les résultats obtenus dans le tableau I. Par contre les échantillons de râpure contiennent des teneurs en fer nettement plus élevées dépassant souvent plus du double de la teneur normale. Ce fer excédentaire ne peut évidemment provenir que d'un enrichissement de la pulpe à son contact avec les parties métalliques de la râpe et plus particulièrement avec les dents. Cette contamination métallique est inévitable dans la pratique, les lames en acier sont seules utilisables, des essais

d'emploi de lames de râpe en acier inoxydable n'ont pas été concluants, leur qualité de coupe ne valant pas, à cette époque celle des lames en acier ordinaire. Mais, il faut remarquer que sur le plan pratique, cette contamination n'a pas d'influence fâcheuse, parce que très limitée, et que le fer accidentel paraît fixé sur la pulpe, le jus de pression n'en renferme que des doses faibles, généralement inférieures à 2 mg par litre, la teneur moyenne étant de 1,58 mg par litre pour les vingt essais rassemblés dans le tableau III.

TABLEAU IV

	Pomme aigre du Calvados		Reinette de la Nonnerie	Grasse Lande (Manche)
	Fer en mg par kg	Cuivre en mg par kg	Fer en mg par kg	Fer en mg par kg
Pulpe nature	2,80	0,454	2,996	3,971
Râpure :				
1	6,47	0,436	4,342	5,760
2	8,08	0,445	4,632	8,762
Jus de pression	2,20	0,373	1,85	1,60

Nota : L'acidité du jus de pommes exprimée en g SO_4H_2 par litre était de :

Pomme aigre du Calvados	6,27
Reinette de la Nonnerie	5,45
Grasse Lande	4,07

Cidres d'étude de variétés séparées.

Le tableau V rassemble les dosages de fer et de cuivre qui ont été effectués sur 115 cidres d'étude qui ont été élaborés par nos soins en partant de lots de pommes de variétés séparées qui nous avaient été envoyés en vue de leur étude technologique. Ces cidres ont été fabriqués comme il a été dit au chapitre précédent. C'est-à-dire qu'au cours des différentes manipulations, ils ne rentrent en contact avec des pièces métalliques pouvant céder du fer, qu'au râpage (contact inévitable) ; la presse étant revêtue d'acier inoxydable et comportant un plateau de même métal, les claies séparant les lits de pulpe étant en aluminium pur ne peuvent enrichir le jus en fer. Le jus de pression est recueilli dans des bidons d'aluminium revêtu d'un enduit intérieur. La seule source de contamination métallique réside dans les lames de la râpe. Mais comme nous l'avons vu précédemment, cette cause d'enrichissement est négligeable pour le jus de pression si la râpe est tenue en parfait état de propreté, et exempte de rouille.

Dans le tableau V nous avons classé à part les cidres de pommes aigres (acidité supérieure à 4 g SO_4H_2 par litre), l'acidité étant un facteur favorisant l'attaque et la dissolution des métaux. Cependant ce facteur ne paraît pas avoir une importance caractérisée, puisque pour les deux

TABLEAU V. — *Le fer et le cuivre dans les cidres d'étude de variétés séparées*

Variétés	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre
Alcadas	1025,5	3,50	1,0	0,338
Avalou Beleien	1035	1,95	0,5	0,552
Barrière	1001	2,15	0,7	0,215
Bedange 1	1000	1,90	1,0	0,475
Bedange 2	1028	2,20	0,8	0,320
Bedange 3	1035	3,08	1,0	0,490
Binet Violet	1023	2,85	1,0	0,305
Bisquet 1	1020	1,90	0,5	0,215
Bisquet 2	1002	1,80	1,0	0,282
Blanc Mollet	1016,5	1,83	0,5	0,350
Bramtôt	1001	1,95	0,5	0,317
Brémontier (Seine-Maritime) :				
1	1002	2,70	2,0	0,328
2	1039	2,30	0,8	0,375
3	1000	2,45	1,5	0,362
4	1001	2,50	1,0	0,248
5	1032	2,40	1,5	0,338
6	1016	2,45	1,0	0,317
7	1031	2,30	2,0	0,420
8	1014	2,50	1,5	0,452
9	1000	1,96	1,0	0,305
10	1014	2,30	2,0	0,408
11	1003	2,25	2,0	0,350
12	1002	2,93	1,0	0,293
13	1000	2,20	0,75	0,295
14	1001	2,45	1,0	0,295
18	1002	2,25	0,8	0,350
20	1021	1,85	1,0	0,452
Cadudal	1019	2,05	1,5	0,282
Carisis Blanc	1025	1,75	1,5	0,260
Carème 1	1013,5	2,35	1,5	0,102
Carème 2	1020	2,60	1,5	0,181
Chailleux	1000	2,95	1,5	0,340
Choperie	1012,5	3,30	0,5	0,270
Clozette	1007	3,80	1,0	0,248
Coquerelle	1026	2,97	1,2	0,362
Crollon	1000	3,10	0,5	0,338
Dameret	1022	3,05	2,0	0,382
Domaines 1	1022	2,25	0,7	0,408
Domaines 2	1002	3,23	0,8	0,237
Douce Glaz	1008	2,10	0,5	0,248
Dous Rous Bihan	1003,5	2,15	1,5	0,316
Doux Amer Gris	1014	1,95	0,8	0,237
Doux d'Août	999	1,90	0,5	0,226
Doux Bouvet	1011,5	1,80	0,3	0,181
Doux Coursier	1000	1,40	1,0	0,226
Doux Crasseux	1030,5	2,05	1,2	0,282
Doux Évêque	1015	2,70	0,8	0,350
Doux Français	1002,5	2,80	1,0	0,270
Doux Geslin	1033	3,43	0,7	0,350
Doux d'Henrieux	1007	2,75	2,0	0,315
Doux Joseph	1017,5	3,55	0,5	0,496
Doux Lalouet	1033,5	2,10	1,0	0,463
Doux de la Launette	1002	3,34	2,5	0,408
Doux Normand	1000	2,00	0,5	0,260
Egyptia 1	1025	2,00	1,0	0,270
Egyptia 2	1008,5	2,23	0,5	0,395
Fertile d'Ablon	1001	1,62	1,3	0,181
Fertile d'I. et V.	1017,5	1,85	1,2	0,327
Frequin Petit	1028,5	2,70	1,5	0,338
Frequin Rouge	1007	3,04	0,8	0,181
Frequin Rouge Petit	1025	2,15	1,0	0,260
Germaine	1000	2,40	0,5	0,170
Grise	1005	1,75	1,0	0,327
Grise Dieppois	1043	2,70	1,0	0,215

Tableau V *(suite)*

Le fer et le cuivre dans les cidres d'étude de variétés séparées

Variétés	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre
Groin d'Ane	1024	2,60	1,5	0,260
Gros Doux	1000	2,40	1,0	0,181
Joly (Beuzeville)	1018,5	2,65	0,5	0,270
Joly Rouge	1007	1,50	1,0	0,260
Latour	1001	1,32	1,5	0,237
Lesla	1001	2,80	1,0	0,338
Mando Burua	1020	1,80	0,5	0,350
Martin Fessard	1009	2,85	2,0	0,384
Merkalina	1001	1,50	0,5	0,248
Mettais	1033	1,90	0,75	0,675
De Moi 1	1003,5	2,30	2,00	0,260
De Moi 2	1016	3,15	1,0	0,260
Moulin à Vent	1046	2,55	0,5	0,441
Noël des Champs	1028	2,40	1,5	0,270
Noire de Vitry	1001	1,60	1,0	0,248
Patzulua	1000	2,70	2,0	0,293
Penn Chopine	1007	2,15	1,5	0,463
Petit Amer	1025	1,75	0,5	0,260
Petite Amère de Bray	1023	2,10	0,5	0,430
Petit Doux	1005	1,75	0,3	0,305
Petite Sorte	1005,5	2,10	1,0	0,193
Petit Rouget	1018,5	1,90	0,8	0,193
Pomme de Miel	1001	2,75	2,0	0,295
Pontcadeuc	1021	2,05	0,7	0,350
Prat Yeot	1029	1,80	1,0	0,226
Quentin	1049	2,40	1,0	0,700
Reine des hâtives	1007,5	1,85	0,3	0,181
Rossignol	999	2,05	0,3	0,192
Rouge Ameret	1001	1,62	1,0	0,248
Saint Philbert	1008	1,85	1,0	0,181
Solage à Gouet	1036	2,45	0,5	0,327
Stang Ru	1033	1,75	0,5	0,365
Tesnières	1015,5	3,53	1,5	0,407
Urdan Ithuri	998	2,10	0,75	0,365
Maximum	1049	3,80	2,50	0,700
Minimum	998	1,32	0,30	0,102
Moyenne		2,33	1,04	0,314
Cidres de pommes aigres				
Aigre Amer	1033	7,40	2,50	0,520
Aigre Jaune du Four	1003	5,78	1,20	0,216
Bellile	1000	5,10	1,50	0,160
Cazo Gris	1013	6,91	1,00	0,316
Chaussy	1006	11,90	1,20	0,170
Coco Goria	1011	4,00	1,50	0,395
Faux Cazo Jaune	1020	4,21	1,50	0,362
Diot Roux	1001	6,07	0,50	0,160
Gatineau	1002	5,10	1,00	0,205
Gilet Rouge	1025	4,10	1,00	0,270
Gros Coco	1021	4,90	0,30	0,125
Jaune de Vitre	1006	5,28	2,00	0,270
Petit Gilet Rouge	1011	8,18	2,50	0,327
Petit Jaune	1017	6,76	1,30	0,248
Portier	1016	5,40	2,50	0,430
Racropi	1002	5,88	1,50	0,147
Renao	1001	7,70	1,50	0,227
Maximum	1033	11,90	2,50	0,520
Minimum	1000	4,00	0,30	0,125
Moyenne		6,16	1,44	0,267

catégories de cidre, les minima et les maxima sont les mêmes en ce qui concerne le fer : 0,30 mg et 2,50 mg par litre, seule la valeur moyenne est un peu plus élevée pour les cidres à forte acidité : 1,44 mg contre 1,04 pour les cidres de variétés peu acides. En ce qui concerne le cuivre, nous ne pouvons pas constater de différences bien sensibles entre les cidres de diverses acidités. La teneur moyenne est de 0,267 mg pour les variétés acides contre 0,314 mg pour les variétés douces ; les fluctuations sont assez importantes : de 0,102 mg à 0,700 mg par litre dans les variétés douces, et de 0,125 à 0,520 mg par litre pour les variétés acides. La variété la plus acide (Chaussy, 11,90 g d'acidité en SO_4H_2) révèle une des plus faibles teneurs en cuivre : 0,170 mg par litre. Comme le cidre ne s'est jamais trouvé en contact avec du matériel contenant du cuivre, ces teneurs sont des doses normales de cuivre biologique. La pomme à cidre se confirme donc comme pouvant renfermer des doses de cuivre susceptibles de varier dans d'assez grandes proportions relatives, de 1 à 7, mais restant toujours faibles en valeur absolue : moins de 1 mg par kg ou par litre de cidre, puisque la moyenne se situe aux environs de 0,300 mg par litre de cidre (calculée sur plus de 100 échantillons de cidres purs) ; ce qui confirme les données du tableau III relatives à 20 pommes à cidre, la teneur moyenne étant de 0,625 mg de cuivre par kg de pulpe, et de 0,200 mg par litre de jus.

Cidres industriels.

Après avoir établi dans les paragraphes et les tableaux précédents, quelles sont les teneurs normales des fruits de pressoir en fer et en cuivre, et enfin les faibles doses auxquelles ces métaux sont présents dans les cidres élaborés avec toutes les précautions désirables, en réduisant au strict minimum inévitable le contact des fruits et du jus avec les parties métalliques pouvant les contaminer, il nous a paru nécessaire et utile de diriger notre attention sur les cidres industriels. Ce sondage a porté sur soixante échantillons qui nous ont été adressés par les principales cidreries des diverses régions cidricoles. Ils peuvent donc être considérés comme représentatifs de la qualité moyenne de la production cidricole industrielle (au point de vue de la contamination métallique).

Le tableau VI qui rassemble les résultats obtenus, est malheureusement riche d'enseignements. Il nous révèle, en effet, qu'un nombre trop élevé d'échantillons : 20 sur 60, soit 1/3, renferment une dose de fer supérieure à 7 mg, teneur à partir de laquelle la casse ferrique est à craindre. Mais ce qui est plus grave et peut amener de gros ennuis à certains industriels, c'est que nous constatons également que certains échantillons dépassent la dose de fer maximum tolérée par les réglements en vigueur : 12 mg par litre ; nous trouvons ainsi 9 échantillons sur 60 qui ne sont plus com-

mercialisables du seul fait de leur teneur trop élevée en fer. Et il y a encore les échantillons qui contiennent des doses de 10 mg de fer au litre, et qui peuvent très bien augmenter leur teneur par une nouvelle manipulation : centrifugation, filtration, embouteillage, avant leur livraison à la clientèle et devenir ainsi également non commercialisables.

TABLEAU VI

Le fer et le cuivre dans les cidres industriels

Échantillon	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre	Échantillon	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre
A 1 ...	1 007	2,20	4,00	0,700	F 1	1 011	4,25	18,00	1,310
2 ...	1 021	2,40	4,50	1,640	(poiré)				
3 ...	1 014	2,00	6,20	2,975	2	1 011	6,80	12,50	0,570
4 ...	1 015	2,35	5,50	0,780	(poiré)				
5 ...	1 022	2,50	6,30	0,820	3	1 037	4,65	12,75	1,030
6 ...	1 019	2,05	4,15	0,630	4	1 039	4,70	16,25	0,780
7 ...	1 008	2,30	7,00	1,300	5	1 039	2,60	2,50	0,580
8 ...	1 004	2,05	5,25	0,750	6	1 041	2,55	3,00	0,550
9 ...	1 008	2,15	7,15	1,040	7	1 029	2,30	7,00	0,950
10 ...	1 010	2,30	7,25	0,675	8	1 028	2,75	16,50	0,975
					9	1 033	3,65	14,30	1,680
B 1 ...	1 006	2,30	1,50	1,160	10	1 023	3,10	3,50	0,452
2 ...	1 011	2,70	4,50	0,890	11	1 025	2,80	4,50	0,700
3 ...	1 006	2,60	2,00	1,070	12	1 025	2,35	12,50	0,930
4 ...	1 020	2,30	3,00	1,200					
5 ...	1 033	1,70	2,50	2,300	G 1	1 035	3,77	2,00	1,940
6 ...	1 027	1,90	2,00	1,700	2	1 050	3,68	4,25	1,025
					3	1 044	3,85	4,30	1,155
C 1 ...	1 026	2,60	3,50	0,765	4	1 049	3,68	3,00	0,910
2 ...	1 003	3,00	4,00	0,840	5	1 049	5,05	5,20	1,600
					6	1 046	4,75	8,00	1,300
D 1 (1)	1 110	4,50	30,0	4,460					
2 ...	1 048	2,65	1,50	0,750	H 1	1 046	2,70	4,00	4,230
3 ...	1 041	2,90	5,00	0,910	2 (2)...	1 038	2,90	1,50	1,440
4 ...	1 034	2,90	3,50	0,770	3	1 031	1,75	2,00	1,120
5 ...	1 034	4,45	8,00	4,200	4	1 028	1,55	2,00	1,460
6 ...	1 025	2,40	3,00	0,930	5 (2)...	1 043	3,40	6,00	2,740
7 ...	1 014	2,40	10,00	1,320					
8 ...	1 032	2,30	10,00	0,950	I 1	1 030	3,25	10,50	1,920
9 ...	1 024	2,40	5,00	0,570	2	1 038	2,90	10,30	1,260
					3	1 041	2,20	14,75	1,920
E 1 ...	1 052	1,80	0,80	3,920	4	1 024	2,30	10,00	0,450
2 ...	1 051	5,35	3,00	4,350	Cidre				
3 ...	1 043	2,35	1,00	2,300	belge...	1 029	2,65	3,00	0,430
4 ...	1 042	2,70	2,00	1,830					
5 ...	1 030	2,40	1,50	1,130					
6 ...	1 015	2,25	1,00	0,570					
					Maxim ..		6,80	30,0	4,460
					Minim. ..		1,70	0,80	0,430
					Moyenne			6,22	1,405

(1) Moût concentré par le froid à moitié de son volume.
(2) Échantillons ayant été traités sur colonne échangeuse d'ions.

Nous insistons encore sur le fait que cette contamination du cidre par le fer est due à un mauvais entretien du matériel de fabrication et de stockage. En effet certaines usines : B, C, E, ne présentent que des échan-

tillons à faible teneur en fer, toujours inférieure à 5 mg par litre. Tandis que pour les autres, ou bien la teneur moyenne se situe aux limites de l'apparition de la casse (6-7 mg) comme A, ou bien cette teneur en fer est très variable de 1,5 à 20 mg par litre, telles D et G, ou bien enfin la dose de fer dépasse trop souvent le maximum toléré légalement, l'exemple le plus spectaculaire étant donné par l'usine F où seulement quatre échantillons sur 12 possèdent une teneur en fer normale, inférieure à 5 mg par litre, mais qui, par contre, présente 7 échantillons sur 12 dépassant 12 mg par litre ; de sorte que la teneur moyenne de l'envoi dépasse 10 mg de fer par litre. L'usine I se range évidemment dans la même médiocre catégorie, puisque ses 4 échantillons dépassent tous 10 mg de fer par litre, la teneur maxima tolérée par la loi risque donc d'être dépassée par toute cette production.

Parmi les cas particuliers contenus dans ce tableau, citons tout d'abord l'échantillon D_1 qui a été amené à la moitié de son volume initial par cryo-concentration. L'analyse nous indique que cet échantillon a acquis par ce traitement une teneur très élevée en métaux : fer et cuivre, due certainement à l'appareil utilisé. Ce concentré devant servir à resucrer des cidres risque de les rendre non commercialisables par excès de fer, surtout que certains échantillons de cette usine renferment déjà des doses de fer très élevées : 8 à 10 mg par litre. De tels cidres recevant 1/5 de moût cryo-concentré atteindraient ou dépasseraient même la dose maxima autorisée.

Un autre cas particulier est constitué par deux échantillons de l'usine H, qui ont été soumis à des essais industriels de déminéralisation par passage sur colonnes échangeuses d'ions. Si ce traitement avait pour but l'élimination des métaux, le résultat n'est pas encourageant, car si l'échantillon H_2 ne présente que 1,5 mg de fer, au litre, l'autre, H_5 en contient 6,0 mg et tous deux renferment de plus des doses élevées en cuivre : 1,44 et 2,74 mg par litre. Cet essai de traitement n'est donc guère concluant dans cet ordre d'idées. Légalement ce genre de traitement n'est pas autorisé. Mais de plus, l'analyse plus approfondie de ces deux cidres déminéralisés nous a révélé qu'ils présentaient une réaction pH anormale (2,70 et 2,60) ; et enfin que leur teneur en matières minérales : 0,910 g et 0,835 g par litre, est inférieure au minimum légal (1,4 g par litre) ; ils ne sont donc plus conformes à la législation en vigueur et ne sont, de ce fait, pas commercialisables.

Le tableau VI nous révèle également que pour la presque totalité, les échantillons analysés présentent des teneurs en cuivre supérieures à la normale. On pourrait donc en conclure que la plupart des cidres sont contaminés par le cuivre au cours de leur fabrication. Si nous rappelons que d'après le tableau V, la teneur moyenne normale des cidres se situe vers 0,250 à 0,300 mg de cuivre au litre, nous devons constater que cette dose

est largement dépassée par les cidres industriels, puisque plus de la moitié des échantillons dépassent 1 mg. de cuivre par litre, alors que sur 115 cidres brassés à notre Station, il n'y en avait que 4 présentant une teneur en cuivre comprise entre 0,50 mg et 0,70 mg par litre.

La teneur moyenne en cuivre des cidres industriels calculée d'après les données du tableau VI s'établit à 1,405 mg par litre, elle est donc supérieure de 1 mg à la teneur normale du cidre en cuivre. On peut donc énoncer que, pratiquement, tous les cidres industriels sont accidentellement enrichis en cuivre et que contrairement au cuivre naturel de la pomme que l'on peut considérer comme fortement complexé dans des combinaisons organiques telles que les oxydases, donc inactif, ce cuivre supplémentaire doit être considéré comme facilement dissociable, et susceptible d'une importante action catalysante dans tous les phénomènes d'oxydation telles que les casses, les troubles au froid ou à la pasteurisation observés dans les cidres. Il faut y ajouter également l'action destructrice bien connue des sels de cuivre pour la vitamine C.

Remarquons enfin pour terminer ces observations, que si les industriels avertis se sont équipés en conséquence et savent protéger leurs produits contre les dangers d'un enrichissement accidentel en fer, leur attention ne s'est pas portée jusqu'ici sur les inconvénients, évidemment moins spectaculaires que la casse ferrique, qui sont provoqués par l'utilisation du cuivre non protégé dans leurs usines. C'est ainsi que, même les usines B, C, E que nous avions citées précédemment comme parfaitement préservées contre une contamination par le fer, sont comme toutes les autres insuffisamment protégées vis-à-vis du cuivre. On pourrait même dire que l'usine E, qui a le mieux résolu le problème de la corrosion du matériel en fer est la plus vulnérable, la moins bien placée par rapport à la corrosion du matériel en cuivre ; en effet, ses 6 échantillons présentent une teneur moyenne en cuivre de 2,350 mg par litre contre seulement 1,550 mg de fer. Il n'est certainement pas possible, industriellement, de faire mieux pour le fer, mais elle est très loin de la perfection pour le cuivre, la teneur de ses cidres dépassant de 2 mg par litre la moyenne susceptible d'être réalisée par des moyens efficaces.

Jus de pommes pasteurisés.

Ainsi que nous l'avons écrit récemment (71) la tendance actuelle du marché de la pomme à cidre, tendance encouragée vivement et pécuniairement par les Pouvoirs Publics, consiste à réduire autant que possible la production d'alcool de pommes, et à reconvertir les distilleries en fabriques de jus de pommes naturels ou concentrés. Actuellement, la fabrication des concentrés est plus que suffisante pour satisfaire les besoins nationaux, et cette industrie qui vient de prendre brillamment un second

départ, cherche déjà dans l'exportation un débouché à ses excédents.

Par contre, l'industrie des jus de pommes pasteurisés connaît un démarrage beaucoup plus laborieux ; cette fabrication étant techniquement plus délicate à réaliser, et, de plus, l'écoulement du produit fabriqué d'autant plus difficile qu'il se heurte à de nombreuses boissons concurrentes à meilleur prix, ou imposées par une publicité bien conduite.

Le jus de pommes peut cependant se créer une place sur le marché français, et peut même prétendre conquérir des débouchés importants grâce au futur Marché Commun Européen, si nos industriels font les efforts nécessaires à la fabrication d'un produit de haute qualité.

Or les qualités d'un jus de fruits dépendent, encore plus que les boissons fermentées, de leur composition minérale, et en particulier de leur teneur en métaux. Un jus de fruits est intéressant pour sa haute valeur hygiénique et nutritionnelle, pour les calories qu'il apporte dans la ration alimentaire, mais aussi par ses oligo-éléments, par la vitamine C. Mais s'il est contaminé par des métaux lourds, par le cuivre en particulier c'en est fait d'une fraction importante de ses avantages sur les autres boissons.

C'est pourquoi nous avons procédé à l'analyse du fer et du cuivre dans quelques échantillons de jus de pommes pasteurisés, dont le tableau VII rappelle les résultats.

TABLEAU VII

Le fer et le cuivre dans les jus de pommes pasteurisés.

Origine	Densité à 15°C	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre
L 1	1 047,3	4,70	4,00	4,050
L 2	1 048,2	4,26	3,00	4,840
L 3	1 047,3	4,55	1,50	4,570
O 1	1 046,5	2,15	5,50	1,700
O 2	1 050,0	1,91	6,70	1,700
P	1 049,0	3,77	1,00	4,180
R	1 047,3	4,02	13,00	2,900
Maximum			13,00	4,840
Minimum			1,00	1,700
Moyenne			4,95	3,420

Si un échantillon seulement, R, présente une teneur exagérée en fer : 13 mg par litre, la qualité laisse beaucoup plus à désirer en ce qui concerne le cuivre. La dose minima est en effet de 1,7 mg par litre, et 4 échantillons sur 7 présentent des teneurs supérieures à 4 mg de cuivre par litre. Après ces résultats, il paraît inutile de parler de vitamine C dans de tels produits. Il reste donc, là aussi, beaucoup à faire, dans cette industrie pour se mettre à l'abri de toute corrosion du matériel, et les spécialistes de cette branche doivent absolument accorder la plus grande attention à la protection de

toutes les parties métalliques, cuivre plus particulièrement, entrant en contact avec la matière première à quelque stade que ce soit de la fabrication.

Jus de pommes concentrés.

Pour satisfaire aux normes fixées par l'arrêté interministériel du 28 janvier 1954, ces produits doivent présenter une densité minima de 37° Bé (Densité : 1,3450), c'est-à-dire qu'ils correspondent à une concentration au moins égale au 1/6 du jus de pommes naturel. Les constituants de ce dernier sont donc concentrés à environ 6 à 7 fois. Les concentrés fabriqués soigneusement ne devraient donc pas présenter des doses de fer supérieures à 20 mg par kilo, ce résultat n'est cependant atteint que pour la moitié des échantillons, la moyenne obtenue avoisine 25 mg au kilo, et 7 échantillons sur 18 dépassent même 30 mg au kilo, ce qui devrait être considéré comme la dose extrême, puisque correspondant au seuil de la casse ferrique dans les cidres. Mais pour ces produits, comme pour les cidres industriels, et cependant à un degré moins prononcé que pour les jus pasteurisés, la teneur en cuivre est presque toujours nettement trop élevée. Seuls, deux échantillons K_4 et K_5 peuvent être considérés comme n'ayant pas subi d'enrichissement accidentel en cuivre. Pour les autres, il y a eu une contamination plus ou moins prononcée par ce métal. En se basant sur les teneurs normales du jus de pommes en cuivre (tableau I) où le maximum trouvé est de 0,700 mg par litre, après concentration, on ne devrait pas dépasser 3-4 mg au kilo, alors que la moyenne obtenue pour les 18 échantillons se situe à plus du double de ce maximum, soit 8,626 mg au kilo. La teneur élevée en cuivre (35 mg par kilo) de l'échantillon M est dûe à ce que ce concentré est fabriqué dans un concentrateur ancien modèle dont une partie est en cuivre. Il y a donc une forte contamination par ce métal au cours de la concentration. Les teneurs des concentrés en cuivre expliquent au moins en partie, les altérations de couleur de ces produits (brunissement) au cours de leur conservation.

Le dernier échantillon mentionné dans le tableau a été fabriqué avec un des premiers concentrateurs utilisés en cidrerie, dans la période 1925-1930. Conservé depuis cette époque, il accuse une coloration noire d'encre causée certainement par sa teneur très élevée en métaux, particulièrement en fer (167 mg. au kg). Dans une publication de 1925, Warcollier (44) cite le cas d'un concentré obtenu en partant d'un moût sulfité à 1 g de SO_2 par litre ; et qui contenait 504 mg de fer et 37 mg de cuivre au litre. Ce concentré sortait d'un concentrateur neuf dont les éléments en cuivre n'avaient pas encore servi.

Les concentrateurs en service actuellement étant presque toujours construits en acier inoxydable, plus rarement en alliage d'aluminium, les concentrés ne s'enrichissent donc pas en cuivre au cours de la concentra-

tion, mais plutôt pendant les opérations préliminaires : extraction du moût, traitement aux enzymes de filtration, collage, filtration et pasteurisation avant concentration. Il est donc nécessaire de veiller soit à éliminer le cuivre des différents récipients, de la tuyauterie et robinetterie, soit à veiller à son bon étamage ou argentage afin d'éviter tout contact du cuivre avec le jus. Les pommes destinées à la concentration sont plus acides que les pommes à cidre ordinaires, leur jus est donc plus agressif et le matériel métallique utilisé dans les usines de concentration devrait encore mieux être protégé contre la corrosion que le matériel classique de cidrerie.

TABLEAU VIII

Le fer et le cuivre dans les jus de pommes concentrés.

Origine	Densité en degrés Baumé	Fer en mg Fe par kg	Cuivre en mg Cu par kg
B 1	39°35	10,0	8,75
B 2	39°45	15,0	9,50
B 3 (poires)	39°20	20,0	7,75
K 1	38°00	17,0	5,82
K 2	37°75	13,5	5,55
K 3	37°75	15,2	6,65
K 4	38°40	14,5	4,10
K 5	37°95	22,0	3,62
K 6	38°00	41,5	9,10
K 7 (poires)	38°85	36,0	7,75
L	38°40	12,5	6,87
M	37°00	32,5	35,00
N 1	38°25	5,0	5,60
N 2	38°35	58,5	12,65
O 1	37°85	31,0	6,95
O 2	37°20	31,75	6,00
O 3	37°30	41,00	7,50
R	39°45	31,0	6,12
Maximum		58,5	35,00
Minimum		5,0	3,62
Moyenne		24,88	8,626
Fabrication vers 1925-30	35°50	167,0	17,50

Bières.

Ayant pu nous procurer quelques échantillons de bières, de table et de luxe, fabriquées dans différentes brasseries de l'Ouest, nous avons jugé intéressant de les confronter aux cidres, au point de vue de leur teneur en métaux.

Le tableau VIII indique les résultats obtenus sur 10 bières différentes. La bière ne renferme que très peu de fer, mais par contre des quantités de cuivre non négligeables. Cette composition s'explique du fait de la faible acidité, donc du peu d'agressivité de la bière pour les métaux. De plus tout au long de sa fabrication : brassage, cuisson, fermentation, filtration, mise en bouteilles, la bière n'est presque jamais en contact avec le fer,

mais souvent avec le cuivre. La quantité de fer trouvée dans la bière vient donc presque exclusivement des matières premières utilisées et de l'eau ; alors qu'une fraction importante du cuivre est due à la corrosion du matériel.

Par rapport aux cidres, la relation entre le fer et le cuivre est inversée dans la bière : alors que dans les cidres la teneur moyenne du fer peut être évaluée de 3 à 6 fois celle du cuivre en absence de toute contamination métallique, et également dans les cidres industriels ; on trouve pour la bière des doses de cuivre doubles ou triples et parfois même sextuples des doses de fer. Pour cette boisson également, le cuivre peut exercer un rôle plus néfaste que le fer sur la limpidité, la formation de troubles au froid ou à la pasteurisation, et sur la conservation, ainsi qu'il l'a été observé par plusieurs auteurs (17).

TABLEAU IX

Le fer et le cuivre dans les bières.

Origine	Densité	Acidité en g SO_4H_2 par litre	Fer en mg Fe par litre	Cuivre en mg Cu par litre
Bordeaux (de table)	1 015	1,00	0,40	0,740
Brest (Pils monopole)	1 014	0,65	0,30	0,766
Brest (Royale 52)	1 012	0,80	0,40	0,563
Moulins (de table)	1 014	0,70	0,40	1,390
Nantes (de table)	1 014,5	1,05	1,05	1,600
Nantes	1 013,0	0,70	0,60	1,000
Nantes 4°8	1 015,0	0,80	0,15	0,817
Nantes 5°5	1 017,0	0,80	0,30	0,430
Rennes (Rhedonia)	1 013,0	0,75	0,15	0,835
Rennes (Siria)	1 015,0	0,82	0,15	1,153
Maximum			1,05	1,600
Minimum			0,15	0,430
Moyenne			0,39	0,929

VII. — INTERPRÉTATION TECHNOLOGIQUE

Nous n'insisterons pas outre mesure sur le rôle néfaste joué par le fer sur la qualité des produits cidricoles. La casse ferrique est un accident suffisamment répandu pour qu'il soit inutile de s'appesantir sur la nécessité, pour le fabricant de cidre, de veiller au bon entretien de tout son matériel métallique, plutôt que d'être toujours à la recherche du meilleur remède curatif nécessité par sa négligence. Il faut d'ailleurs reconnaître que les industriels cidricoles, dans leur ensemble, ont fait un effort marqué pour éliminer des tables familiales ou des restaurants les cidres qui noircissent quelques minutes après avoir été versés dans le verre du consommateur. Ils ont d'ailleurs sanctionné officiellement leur volonté d'améliorer, à cet égard, la qualité du cidre de consommation courante puisqu'ils ont fait introduire dans le dernier réglement d'Administration Publique

(Décret n° 53-978 du 30 septembre 1953) la clause suivante : « Les cidres et poirés doivent présenter les caractéristiques suivantes pour être considérés comme propres à la consommation :

Teneur en fer : maximum par litre, 12 milligrammes... »

Cependant, nous avons vu dans le chapitre consacré aux cidres industriels que sur 60 échantillons examinés, il y en avait encore 9 présentant une teneur en fer supérieure à ce maximum légal. Il y a donc encore beaucoup à faire dans le secteur industriel, d'abord pour ne présenter au consommateur que des cidres conformes à la Législation en vigueur, et surtout pour fabriquer des cidres échappant au danger de la casse ferrique, c'est-à-dire renfermant moins de 6-7 mg de fer par litre.

Mais les plus gros efforts dans ce sens doivent être accomplis par la cidrerie paysanne qui ne dispose que d'un équipement assez rudimentaire, il est vrai, mais surtout fort mal entretenu, les pièces métalliques trop souvent converties de rouille, de sorte que la majorité des cidres fermiers dépasse et souvent de loin le maximum légal, et que la plupart des cidres livrés en ville par la cidrerie paysanne sont atteints de casse ferrique et portent ainsi un gros préjudice à la consommation de cette boisson.

Quant au cuivre, les techniciens de la cidrerie ne se sont guère inquiétés jusqu'ici des conséquences fâcheuses, qu'il pouvait provoquer dans les cidres, les jus pasteurisés et les concentrés. Il est vrai qu'aux doses de quelques milligrammes où on le rencontre dans ces produits il n'occasionne pas d'accidents visibles comme la casse cuivreuse des vins blancs. Cependant, les propriétés catalysantes de ce métal étant bien connues il importe de prendre toutes les précautions possibles pour éviter le passage dans le cidre ou le jus de pommes des petites doses de cuivre suffisantes pour catalyser les réactions d'oxydation de leurs divers constituants : polyphénols, acide ascorbique, etc. ce qui se traduit par la destruction de la vitamine C du jus de pommes, et la formation de troubles non biologiques, ainsi que l'ont montré TIMBERLAKE et coll (19), dans les bouteilles de jus de pommes pasteurisés. Les industriels doivent donc éviter le contact, même très court, du jus de pommes et du cidre avec le cuivre. Ce métal passe rapidement en solution dans les jus même peu acides, car les sucres de la pomme et plus spécialement le lévulose dissolvent le cuivre, même en absence de tout acide. Nous le savions déjà par un travail de TAVERNIER (21), et nous avons voulu nous faire une idée de l'ordre de grandeur de la solubilité du cuivre dans diverses solutions par l'expérience suivante :

On laisse en contact pendant 14 jours, un copeau de cuivre du poids de 0, 400 g avec 100 cc de chacune des solutions suivantes de sucres ou d'acides à des concentrations telles qu'ils existent dans un jus de pommes de composition moyenne :

1. lévulose à 60 g par litre ;
2. glucose à 20 g par litre ;
3. saccharose à 20 g par litre ;
4. mélange des 3 sucres titrant :
   lévulose 60 g par litre ;
   glucose 20 g par litre ;
   saccharose 20 g par litre ;
5. acide malique à 5 g par litre ;
6. acide citrique à 5 g par litre ;
7. solution sucres et acide malique titrant :
   lévulose 60 g par litre ;
   glucose 20 g par litre ;
   saccharose 20 g par litre ;
   acide malique 5 g par litre ;
8. concentré dilué 6 fois (dosant au départ 1,225 mg de Cu par litre).

Après le contact de 14 jours, les essais n° 5, 6, 7 avaient pris une teinte plus ou moins bleutée. On dosa alors les quantités de cuivre passées en solution dans chaque échantillon, ce qui donna les résultats suivants :

N°	Cuivre dissous en mg par litre
1. Lévulose	20,3
2. Glucose	4,58
3. Saccharose	4,20
4. Mélange des 3 sucres	15,35
5. Acide malique	250,0
6. Acide citrique	232,5
7. Mélange des 3 sucres + acide malique	58,0
8. Concentré dilué	15,75

La dissolution du cuivre est donc très importante dans les acides malique et citrique, ce qui était évident et n'avait pas à être démontré, mais nous voyons que la solution de lévulose dissout 20 mg de cuivre et le mélange des trois sucres sans acide dissout 15,35 mg de cuivre, et 58 mg de cuivre au litre lors qu'il est acidifié de 5 g d'acide malique. Le concentré dilué qui avait une acidité de titration un peu faible : 3,5 g en acide malique, s'est enrichi de 14,53 mg de cuivre par litre. La dissolution du cuivre est donc très rapide et de l'ordre de 1 mg par litre et par jour pour des liquides artificiels de composition semblable à celle des cidres ou jus de pommes.

Signalons enfin qu'au cours de la fermentation, le cuivre diminue dans la boisson et se retrouve dans les lies, soit qu'il soit fixé sur les cellules de levure, soit qu'il se précipite en combinaison avec des tannoïdes ou des albuminoïdes. Un échantillon de cidre (variété Quentin) soutiré après défécation, à la densité de 1 049 a été additionné de 10 mg de cuivre du sulfate par litre et mis à fermenter à l'étuve à 25°. Après huit jours, la densité était tombée à 1 003, et le cidre obtenu a été centrifugé ; le cuivre

a été dosé sur le cidre limpide et sur les boues de centrifugation, les résultats sont les suivants :

	Densité à 15°C.	Acidité de titration en g SO_4H_2 par litre	Cuivre total en mg Cu.
	—	—	—
Cidre avant addition de cuivre	1049	2,40	0,70
Cidre centrifugé après fermentation	1003	—	1,27
Boues de centrifugation			9,75

Ainsi sur 10 mg de cuivre ajouté au cidre, on n'y retrouve après fermentation que 1,27 — 0,70 = 0,57 mg par litre ; par contre les boues de centrifugation renferment la presque totalité du cuivre ajouté soit 9,75 mg.

Ce fait avait déjà été signalé en brasserie par WEBER et coll. (72) qui ont trouvé qu'en début de fermentation la levure éliminait une partie du cuivre présent et que la plus grande partie du cuivre était éliminée dans le dépôt de lies.

S'il est difficile de faire la part de la levure et des autres substances dans ce processus, il n'en résulte pas moins sur le plan pratique, que, par fermentation, la plus grande partie du cuivre présent est précipitée et se retrouve dans les lies, la fermentation purifie donc le milieu du cuivre qui le souillait, et on ne peut que regretter qu'il n'en soit pas de même pour le fer.

Cette action favorable de la fermentation sur l'insolubilisation du cuivre explique pourquoi les cidres fermentés renferment généralement moins de cuivre que les jus de pommes et les cidres doux. Mais il ne faut pas oublier que si un cidre sec se retrouve après fermentation en contact avec du cuivre, soit par filtration, centrifugation ou passage dans une tuyauterie en cuivre, il risque de se contaminer à nouveau et de redissoudre du cuivre, que l'on ne peut plus espérer être éliminé naturellement puisque la fermentation est terminée. On peut également conclure de cette dernière expérience que si un cidre sec renferme plus de 1 mg de cuivre par litre, c'est qu'il aura été mis en contact avec ce métal après sa fermentation terminée.

Nous tirerons les enseignements de ces essais en attirant encore l'attention des techniciens des industries cidricoles sur l'intérêt qu'ils ont à surveiller tout leur matériel, tous leurs appareils, tuyauterie et robinetterie comprises, afin que jamais, tout au long de l'élaboration, la matière travaillée ne se trouve en contact direct avec un métal susceptible d'être corrodé. Bien que ces industries soient alimentaires, ce n'est pas au point de vue hygiène alimentaire que nous nous plaçons, mais seulement au point de vue technologique, car il est évident qu'aux doses où on les rencontre habituellement dans les boissons dérivées de la pomme, on ne peut attribuer au fer et au cuivre une action toxique sur l'organisme

humain. La Commission d'étude des substances étrangères dans les aliments (73) a d'ailleurs proposé comme taux limites pour le fer : 20 mg par litre dans les vins, les bières, les cidres et 50 mg dans les jus de fruits, et pour le cuivre : 1 mg par litre dans les vins, 2 mg dans les bières, cidres, et 8 mg dans les jus de fruits. Au-dessus de ces taux, ces métaux sont considérés comme substances étrangères, et d'après les propositions de cette Commission, « En cas de dépassement, il appartient au fabricant de prouver que la quantité de substance étrangère trouvée en excès provient de la matière alimentaire elle-même... » (On peut penser que la Commission s'est montrée particulièrement généreuse pour les jus de fruits).

Dans son rapport sur le cuivre à cette même Commission, KOHN-ABREST (74) propose également comme taux limites : 2 mg par litre pour les vins, bières, cidres et 8 mg par litre pour les jus de fruits.

Si on applique ce taux limite du cuivre aux cidres industriels du tableau V, on s'aperçoit que 9 échantillons sur 60, soit 15 p. 100 seraient atteints par cette clause, c'est exactement la même proportion trouvée pour les échantillons dépassant les 12 mg de fer tolérés par la Législation sur les cidres. Et comme ce ne sont pas les mêmes échantillons, à une exception près, qui se trouvent ainsi en défaut, nous arrivons à un total de 17 échantillons sur 60, soit 28 p. 100 qui ne seraient pas conformes aux exigence de l'hygiène alimentaire. Il est inutile d'insister sur l'importance de cette proportion qui chiffre ainsi les efforts qui restent à accomplir par la cidrerie industrielle pour présenter au consommateur des boissons de qualité.

Il serait préférable que les industriels de la pomme se prémunissent dès maintenant contre les contaminations métalliques ; sur le marché français ils y sont déjà obligés pour le fer depuis 1953, et peuvent l'être dans un avenir prochain pour le cuivre. Mais si l'on veut envisager l'exportation de nos produits finis, ceux-ci risquent de se heurter à des exigences étrangères encore plus draconiennes que les normes françaises, et les espoirs de débouchés extérieurs peuvent se trouver irrémédiablement compromis.

Pour pouvoir lutter efficacement contre les dangers de contamination métallique, il est nécessaire que les industriels en connaissent les causes principales. Il est évident que les aliments en général, les produits de la pomme en particulier, renferment d'assez nombreux métaux à l'état de traces : leur présence y est naturelle, comme l'ont montré les tableaux I, II et III pour le fer et le cuivre. A ces taux très faibles, ces métaux ne présentent aucun inconvénient. Ils ne commencent à être dangereux que lorsque leur concentration dépasse un certain seuil très variable pour chaque métal, en dehors de la toxicité ; pour le cuivre on peut fixer le seuil à 1 mg par litre, alors qu'il peut être élevé à 5-6 mg. pour le fer dans les cidres.

Les concentrations métalliques peuvent s'accroître dans de grandes proportions :

— par l'utilisation de pesticides qui peuvent souiller les fruits de cuivre, d'arsenic, de plomb, si le traitement a précédé de peu la récolte. Ce risque n'est guère à craindre en cidrerie, les traitements des vergers de fruits à cidre étant exceptionnels, mais peut se présenter dans l'industrie des jus de fruits qui peut être amenée à travailler des déchets de triage de pommes de table ;

— par usure et frottement du matériel métallique au contact de la matière première, ainsi l'usure des lames de râpe au contact des pommes et poires.

— par corrosion des métaux sous l'action des constituants de la pomme : attaque des pièces métalliques par les acides malique et citrique des pommes et poires ; de même, attaque de la cuverie de béton mal protégée ; cette cause de contamination est certainement de loin la plus importante en cidrerie, puisque tout au long de sa fabrication, le cidre est en contact avec du matériel, des appareils ou de la cuverie susceptibles de lui abandonner du métal : râpe, bacs de réception, trémies, vis d'Archimède, presses, tuyaux et robinets de cuivre ou d'alliage cuivreux, pompes, filtres, centrifugeuses, cuves de fermentation et de garde métalliques ou en béton, embouteilleuses, pasteurisateurs, etc.

— par électrolyse entre deux métaux différents : robinetterie de cuivre garnissant un tank d'acier ou d'aluminium par exemple ;

— par corrosion des métaux sous l'action des détergents utilisés pour le nettoyage du matériel ; il faut évidemment rejeter tout détergent qui manifesterait une agressivité tant soit peu prononcée vis-à-vis du matériel.

— enfin la corrosion peut être due à un entretien défectueux du matériel, à une absence de nettoyage ou à un nettoyage insuffisant de tout l'appareillage entre les périodes d'utilisation, une râpe mal nettoyée par exemple, se couvre rapidement de rouille, et les premières portions de pulpe entraînent cette rouille qui passe en solution dans le jus.

Il importe donc de lutter contre toutes ces causes de corrosion, de les prévenir, et les possibilités actuelles de l'industie métallique et de l'industrie des plastiques doivent permettre aux industriels de résoudre favorablement tous les problèmes qui leur sont posés. Ils ont maintenant à leur disposition toute une gamme de métaux ou d'alliages nouveaux, de plastiques et d'enduits qui sont susceptibles de leur donner toute satisfaction. Il faut éliminer radicalement du matériel et de l'appareillage toutes les parties en fer, en cuivre ou en alliages de ces métaux qui peuvent se trouver en contact direct et prolongé avec les produits fabriqués si ces pièces métalliques ne peuvent pas être protégées efficacement et durablement de la corrosion par un procédé éprouvé : émaillage, étamage, argentage.

Sans quoi on s'efforcera de remplacer fer et cuivre par de l'acier inoxydable, à 18 p. 100 de nickel et 8 p. 100 de chrome, par exemple, qui est le plus résistant et sera à conseiller toutes les fois qu'il y a contact prolongé avec les acides organiques. On dispose également d'aluminium à 99,8 p. 100 de pureté, ou des différents alliages de ce métal, lorsque le contact est limité, et avec revêtement pour les tanks de garde. La robinetterie peut se faire également en acier inoxydable. Enfin la tuyauterie de cuivre sera avantageusement remplacée par les tuyaux en matière plastique.

Signalons également la possibilité de remplacement des enduits de cuves de fermentation par la pose sur les parois internes des cuves de béton d'une feuille de plastique.

Enfin dans le domaine des plastiques, une nouveauté vient de faire son apparition sur le marché : les tanks de garde fabriqués entièrement en matière plastique armée de fibres de verre (75), dont la capacité est limitée jusqu'ici à 60 hl. mais la fabrication de tanks plus volumineux doit être entreprise incessamment. Ces tanks sont complètement indifférents au contenu : jus de fruits, cidre, vin, vinaigre ou alcool, ils résistent parfaitement à la corrosion, sans enduits, ils sont résistants aux chocs, suffisamment à la chaleur : jusqu'ici 120° (ils sont donc stérilisables à la vapeur) ; ils sont translucides et extraordinairement légers : un tank de 60 hl pèse environ 175 kg. En 1957 il existait déjà une cuverie de 20 000 hl de ces nouveaux récipients. Ils ont été éprouvés avec une entière satisfaction, pour le stokage de jus de cerises aigres, de jus de pommes et de cidres par la Station de Recherches de Viticulture et d'Arboriculture de Geisenheim. Précisons pour terminer que le prix de ce nouvel équipement serait du même ordre que celui des tanks en aluminium avec revêtement intérieur.

L'industrie cidricole dispose donc actuellement des matériaux aptes à résister à toute corrosion et à concourir à la fabrication de produits de haute qualité.

Mais un équipement résistant de façon très satisfaisante à la corrosion n'évitera jamais la nécessité d'un nettoyage poussé et minutieux de tout appareil après chaque période d'utilisation intensive. Il importe, en particulier, de ne pas négliger le nettoyage complet du samedi si l'usine doit s'arrêter jusqu'au lundi. Nous rappellerons à ce sujet l'accident signalé par TAVERNIER (21) qui se produisait régulièrement dans la fabrication restant en suspens pendant le week-end.

Et à propos du nettoyage, attirons encore l'attention des techniciens sur l'importance du choix des détergents utilisés, en fonction de leur agressivité possible envers les métaux sur lesquels ils seront appliqués.

Nous n'insisterons pas sur les différents procédés d'élimination du fer et du cuivre dans les produits cidricoles. Dans ce domaine comme ailleurs, mieux vaut prévenir que guérir. Pour le fer, nous avons traité la

question avec la collaboration de CREFF dans un mémoire publié dans ces Annales(1). Rappelons seulement que le remède le plus efficace de la casse ferrique est encore l'addition d'acide citrique. Ce produit fait bien disparaître cet accident, mais n'élimine pas le fer, et le cidre même guéri est toujours légalement impropre à la consommation si sa teneur en fer dépasse 12 mg. par litre. Quant au cuivre, il n'existe pas de traitement curatif toléré par la Législation actuelle des cidres et produits cidricoles.

Pour remédier à ces contaminations et améliorer la qualité des produits consommés, les Législations française et étrangères, tendent à devenir de plus en plus sévères et à imposer des normes de plus en plus strictes quant aux tolérances vis-à-vis des doses de métaux contenus dans les aliments. La cidrerie n'échappe pas à ces réglements, puisque la teneur maxima du cidre en fer ext fixée à 12 mg par litre, et que le cuivre ne devrait pas dépasser 2 mg par litre.

Il importe, pour l'avenir de la production cidricole française que les industriels soient bien avertis des conséquences fâcheuses résultant pour leurs fabrications de ces contaminations par des traces métalliques trop élevées.

Il apparaît donc nécessaire que l'industrie cidricole s'équipe en matériel et appareils constitués de métaux, alliages, ou autres matières parfaitement adaptées à la nature des constituants de la pomme et susceptibles de résister au mieux à la corrosion des acides organiques de la matière première. Ce choix judicieux des matériaux lui permettra de fabriquer des produits de meilleure qualité, échappant à de nombreux accidents dont les plus néfastes ne sont pas les plus spectaculaires. De plus, les industriels peuvent espérer ainsi amenuiser leurs pertes en produits finis par altération de leurs constituants : casse ferrique, troubles et dépôts, tout en leur conservant au maximum leur intégralité biologique (préservation de la vitamine C), et leurs qualités intrinsèques. Enfin il n'est pas indifférent de préciser que le matériel de l'usine aura en général une durée de service d'autant plus longue qu'il aura été mieux entretenu, mieux nettoyé, et que les produits fabriqués contiendront moins de traces métalliques.

VIII. — CONCLUSIONS

Grâce aux fines méthodes analytiques dont dispose maintenant la biochimie, nous savons que le fer et le cuivre sont des éléments universellement répandus dans le règne végétal et animal. La présence de ces métaux à l'état de traces préserve les organismes végétaux et animaux de certaines maladies de carence pouvant entraîner la mort. Ces oligo-éléments contribuent avec beaucoup d'autres au métabolisme des gros matériaux de l'édifice vivant, à leur incessant remaniement. Le fer, animateur des

transferts d'électrons et des oxydations cellulaires, composant actif de l'hémoglobine, des cytochromes, des peroxydases, des catalases, et le cuivre, nécessaire à l'hématopoïèse, constituant la complémentaire active des polyphénoloxydases protéiques, et intervenant comme catalyseur dans de nombreux processus d'oxydation, sont vraiment des éléments physiologiquement indispensables.

Il n'est donc pas surprenant, que, comme tous les éléments végétaux, les matières premières de l'industrie cidricole renferment de petites quantités de ces métaux. Mais à ces traces de fer et cuivre de l'ordre du milligramme à leur concentration normale dans la pomme et la poire s'ajoutent trop souvent, dans les produits fabriqués, des quantités parfois importantes de métaux provenant principalement de la corrosion du matériel d'extraction, de purification ou de stockage.

Ces métaux exogènes sont à l'origine de graves accidents biochimiques et d'ennuis technologiques. Il faut tendre, par une technique appropriée et des matériaux choisis, à leur élimination.

Reçu pour Publication le 5 Août 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Tavernier (J.) et Jacquin (P.). — Contribution à l'étude de la casse ferrique des cidres. *Bull. Assoc. Chim.*, **62,** 1-3, 57, 1945.

(1) Creff (R.) et Jacquin (P.). — La casse ferrique des cidres. Étude critique de quelques méthodes curatives et préventives d'élimination du fer. *Ann. INRA. Technol.*, **2,** 3, 153, 1953.

(2) Brugirard (A.) et Tavernier (J.). — Les matières tannoïdes dans les cidres et les poires. *Ann. INRA. Technol.*, **1,** 3, 311, 1952.

(3) Deschreider (A. R.). — Le rôle des traces de métal dans l'altération des denrées alimentaires. *Vita.*, XII, **15,** 755 ; **16,** 819 ; et **17,** 863, 1955.

(4) Lüthi (H.). — Die Bedeutung der enzymatischen Oxydation unserer Fuchtsäfte. Schweiz. Zeitsch. Obst-Weinb., **63, 22,** 455 ; **23,** 469 et **24,** 494, 1954.

(5) Gero (E.). — Recherches relatives au mécanisme de l'activité des vitamines C (Rapport succinct). *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **43,** 4-5-6, 68, 1955.

(6) Benvegnin (L.), Capt (E.) et Michod (J.). — Essais d'identification du goût métallique des jus de raisin. *Ann. Agr. Suisse,* **66,** 9, 1129, 1952.

(7) Koch (J.) und Brecker (E.). — Ueber die Bestimmung von Schwermetallen in Traubensäften (Traubensüssmost). *Ind. Obst und Gemüseverwert.*, **12,** 252, 1955.

(8) Baumann (J.). — Handbuch des Süssmosters, p. 228 et 229. Eugen Ulmer. Stuttgart, éditeur, 4e édition, 1951.

(9) Dean Guelbenzu (M.). — Nota sobre el contenido en oligoelementos de las cenizas de vino y vinagre. *Ann. Bromatologia.*, **4,** 319, 1951.

(10) Mrak (E. M.), Cash (L.) and Caudron (D. C.). — Effects of contain metals and alloys on claret and Sauterne-type wines made from vinifera grapes. *Food Research.*, **2,** 539, 1937.

(11) Nègre (E.) et Cordonnier (R.). — Les origines du fer des vins. *C. R. Acad. Agr. Fr.*, **39,** 1, 52, 1953.

Cordonnier (R.). — Le fer et ses origines dans le vin. *Ann. INRA. Technol.*, **2,** 1, 1, 1953.

(12) Dupuy (P.), Nortz (M.) et Puisais (J.). — Le vin et quelques causes de son enrichissement en fer. *Ann. INRA. Technol.*, **4,** 1, 101, 1955.
(13) Flanzy (M.) et Deibner (L.). — Sur la variation des teneurs en fer dans les vins, obtenus en présence ou en absence d'une terre ferrugineuse. *Ann. INRA. Technol.*, **5,** 1, 69, 1956.
(14) Jaulmes (P.). — Analyse des Vins. 2e éd. Poulain éditeur, Montpellier 1951.
(15) Ribereau-Gayon (J.). — Traité d'Œnologie. Librairie Polytechnique Béranger. Paris, 1947.
(16) Sapondjan (S. O.) et Guevorkian (K. S.). — Influence des métaux lourds sur le processus de formation des vins de Xérès (en Russe). *Vinodel Vinograd* (SSSR), **13,** 11, 18, 1953.
(17) Bengough and Harris. — General composition of non biological hazes of beer and some factors in their formation. Part. I. *J. Inst. Brew.*, **61,** 134, 1955.
(18) Window (I. G.) and Williams (I. C.). — Glasspipes in the food industry. *Food.*, **21,** 364, 1952.
(19) Kieser (M. E.), Pollard (A.) and Timberlake (C. F.). — Metallic components of fruit juices. I. Copper as a factor affecting sedimentation in bottled apple juices. *J. Sc. Food Agric.*, **3,** 151, 1957.
(19) Timberlake (C. F.). — Metallic components of fruit juices. II. The nature of some copper complexes in apple juice. *J. Sc. Food Agr.*, **3,** 159, 1957.
(20) Deschreider (A. R.). — Influence de traces de cuivre et de glycérine sur les colorations du sirop de glucose chauffé. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **9,** 1, 25, 1954. — Le rôle de certains acides aminés et de traces métalliques dans la coloration du sirop de glucose chauffé. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, **9,** 3, 111, 1954.
(21) Tavernier (J.). — Sur deux cas curieux de formation de sulfures métalliques. *Bull. Soc. Scienc.* Bretagne, **22,** 1-2-3-4, 53, 1947.
(22) Lafon (J.) et Couillaud (P.). — Sur la présence de cuivre dans les eaux-de-vie de Cognac. *Ann. INRA. Technol.*, **2,** 1, 41, 1953.
(23) Nègre (E.) et Cordonnier (R.). — Élimination du cuivre des eaux-de-vie par les phytates de calcium et de sodium. *C. R. Acad. Agr. Fr.*, **39,** 17, 776, 1953.
(23) Cordonnier (R.). — L'élimination du cuivre dans les eaux-de-vie par les phytates de calcium et de sodium. *Ann. INRA. Technol.*, **3,** 2, 179, 1954.
(24) Tourlière (S.). — Les problèmes de corrosion en distillerie. *Ind. Agr. Alim.*, **70,** 7-8, 547 et 9-10, 637, 1953.
(25) Krukovsky (V. N.). — The origin of oxidized flavors and factors responsible for their developpment in milk and milk products. *J. Dairy Sc.*, **35,** 21, 1952.
Krukovsky (V. N.) and Guthrie (E. S.). — Vitamin C, hydrogen peroxyd, copper and the tallowy flavour in milk. *J. Dairy Sci.*, **29,** 5, 293, 1946.
(26) Pont (E. G.). — Studies in the origin of oxidized flavour in whole milk *The J. of Dairy Res.*, **19,** 3, 316, 1952.
(27) Mulder (H.), Kruisheer (C. I.) ,den Herder (P. C.) and Van Ginkel (J. G.). — The effect of copper, iron and manganese salts on the flavour and the keeping quality of butter. *Neth. Milk Dairy J.*, **3,** 37, 1949.
(28) Kruisheer (C. I.), den Herder (P. C.), Werker (W.) and van Ginkel (J. G.). — On the effects of metals on butter in cold storage. *Neth. Milk Dairy J.*, **3,** 25, 1949.
(29) Van Haeften (F. E.) and Pette (I. W.). — Over de vissigheid van koelhuisboter. *Neth. Milk Dairy J.*, **7,** 41, 1953.

(30) Piraux (E.) et Jamotte (P.). — De opslag van boter in het koelhuis. De invloed van het kopergehalte op de geschiktheid voor opslag. *Conserva*, **2**, 137, 1953.
(31) Alifax (R.) et Bejambes (M.). — Dosage simultané du fer et du cuivre dans le lait et les produits laitiers. *Ann. INRA Technol.*, **5**, 4, 619, 1956.
(32) Husaini (S. M.) and Saletore (S. A.). — The effects of metals on vegetable oils. *Indian Soap J.*, **18**, 6, 192, 1952.
(33) Rams (V. P.). — L'influence des impuretés métalliques sur la stabilité de l'huile de palme. *Oléagineux*, **10**, 177, 1955.
(34) Meschter (E. E.). — Fruit color loss-effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. *Agr. and Food Chem.*, **1**, 574, 1953.
(35) Livingston (G. E.), Solstad (Mary Ann), Vilece (R. J.) and Esselen (W. B.). — The role of trace metal contamination in the discoloration of glass packed baby foods. *Food Technol.*, **8**, 7, 313, 1954.
(36) Kitson (J. A.) and Strachan (C. C.). — Candied fruit metallic discoloration. Process. Lab. Exp. Stat. Summerland (Canada), 1955.
(37) Stein (J. A.) and Weckel (K. G.). — Factors affecting the color stability of frozen Montmorency cherries. *Food Technol.*, **8**, 10, 445, 1954.
(38) Butland (P.). — The darkening of Maraschino and glace cherries. *Food Technol.*, **6**, 208, 1952.
(39) Delindati (G.). — Il rame la vitamine C nelle conserve di pomodoro. *Ind Ital. Cons.*, **25**, 6, 187, 1950.
(40) Braun (O. G.). — Problemes of metals in canning equipment. *Canner*, **112**, 24, 13 et 24, 1951.
(41) Sedky (A.), Stein (J. A.) and Weckel (K. G.). — Factors affecting color and flavor of sauerkraut packaged in pliofilm bags. *Food Technol.*, **6**, 208, 1952.
— Efficacy of added ascorbic acid in the control of discoloration of Kraut. *Food Technol.*, **7**, 67, 1953.
(42) Scheunert (A.) und Reschke (J.). — Ueber die grünung von Gemüsekonserven in Hinblick auf ihren vitamin C Gehalt. *Zeitsch. Unters. Lebensm.*, **74**, 21, 1937.
(42) Diemair, Timmling und Fox. — Ueber den vitamin C Gehalt von Gemüse und Obstkonserven. *Vorratspfl. ù. Lebensm. Forsch.*, **2**, 152, 1939.
(42) Gutschmidt (I.). — Ueber den Einflüss des Dosenmaterials auf den vitamin C gehalt von Obst und Gemüse. *Indust. Obst-Gemüseverw.*, **37**, 325, 1952.
(43) Meunier (P.). — La vitamine C. Cours-Conférence du Centre de Perfectionnement technique, fascicule 611, 1941.
(43) Vogel (H.). — Chemie and Technik der Vitamine. Enke Stuttgart éditeur, 1943.
(43) Charley (V. L. S.) et Coll. — Recent advances in fruit juice production. Technic communication n° 21. Commonwealth Bureau of Hort. and Plant Crops editeur, 1950.
(44) Warcollier (G.). — Accidents de fabrication dans les industries de la pomme. Communication présentée au 5e Congrès de Chimie Industrielle. 1925.
(44) Warcollier (G.) et Tavernier (J.). — Emploi de métaux et alliages résistant à la corrosion pour le matériel de cidrerie. Le métal Monel. Rapport sur le fonctionnement de l'I.R.A. pendant l'année 1930-31. Vol. IX, 294.
(44) Warcollier (G.) et Tavernier (J.). — Emploi de métaux et alliages résistant à la corrosion pour le matériel de cidrerie. Communication présentée au IIIe Congrès International Technique et Chimique des Industries Agricoles. Paris, 1934. *La Cidrerie Française*, **1**, 7, 1935.

(44) WARCOLLIER (G.) et TAVERNIER (J.). — Emploi de métaux et alliages résistant à la corrosion pour le matériel de cidrerie. Communication présentée au IVe Congrès International Technique et Chimique des Industries Agricoles. Bruxelles, 1935.
(44) WARCOLLIER (G.) et TAVERNIER (J.). — Emploi des métaux dans l'industrie Cidrière. L'inconel, alliage de nickel. *Bull. Assoc. Chim.*, **59,** 5-6, 464, 1942.
(45) PATRON (A.). — Les aciers inoxydables et les industries de transformation des fruits. *Fruits*, **7,** 8, 361, 1952.
(46) KOCH (J.) und BREKER (E.). — Ueber den Einfluss nicht ausgekleideter Aluminiumtanks auf die Beschaffenheit darin gelagerte Süssmoste. *Die Fruchtsaft Indus.*, **3,** 1, 3, 1958.
(47) BROWN (J. W.). — Chemical studies in the physiology of apples. V. Methode of ash analysis and the effect of environment on the mineral constitution of the apples. *Ann. Botany*, **40,** 129, 1926.
(48) SHERMAN (H. C.). — Chemistry of Food and Nutrition. 7e édit. Macmillan New-York, 1946.
(49) TIMBERLAKE (C. F.). — The content of arsenic ,copper, iron, lead and zinc in apples, juices and ciders. *The Ann. Report. Agr. Hort. Res. Stat. Long Ashton.*, **160,** 1951.
(50) GUERITHAULT (B.). — Recherche sur la présence du cuivre chez les végétaux et dans l'organisme humain. Thèse Pharm. Sup. Paris, 1927.
(51) JAVILLIER (M.). — Les éléments chimiques et le monde vivant. Flammarion, Paris, 1952.
(52) LAVOLLAY (J.), PATRON (S.) et PATRON (A.). — La composition chimique des fruits envisagée du point de vue alimentaire. *Bull. Soc. Scien. Hyg. Alim.*, **39,** 7-8-9, 145, 1951.
(53) LEDERER (J.). — Le fer dans l'alimentation. *Bull. Soc. Scientif. Hyg. Alim.*, **40,** 4-5-6, 89, 1952.
(54) ROBICHET (O.). — Méthodes de dosage du fer. *Ann. I. N. R. A. Agron.*, **8,** 2, 257, 1957.
(55) BANDEMER (S. L.) and SCHAIBLE (P. J.). — Determination of iron. A study of the o-phenanthroline method. *Ind. and Eng. Chem. Anal.*, **16,** 5, 317, 1944.
(56) RIBEREAU-GAYON (J.). — Dosage rapide du fer dans les vins blancs. *Ann. Falsif. Fraudes*, **22,** n° 251, 522, 1929. — Dosage colorimétrique du fer total et du fer trivalent dans les vins rouges. *Ann. Falsif. Fraudes*, **26,** n° 293, 297, 1933.
(57) DEIBNER (L.). — Microdosage iodométrique du fer et son application au dosage du fer dans les vins et les jus de fruits. Thèse Montpellier, 1949.
(58) DEIBNER (L.) et BOUZIGUES (H.). — Dosage électrophotométrique de traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénanthroline. *Ann. I. N. R. A. Technol.*, **1,** 3, 283, 1952.
(58) DEIBNER (L.) et BOUZIGUES (H.). — Les méthodes de dosage colorimétrique de traces de fer dans les vins. *Ann. I. N. R. A. Technol.*, **2,** 1, 65, 1953.
(59) VENTURA (S.) and WHITE (J. C.). — The determination of iron and copper in single serum samples. *Analyst*, **79,** 39, 1954.
(60) BRETTHAUER (G.). — Ueber den Eisengehalt der Süssmoste. *Die Fruchtsaft Ind.*, **1,** 184, 1956.
(61) BENCZE (B.). — Die photometrische Bestimmung des Eisens mit o-Phenanthrolin. *Z. anal. Chem.*, **128,** 179, 1948.
(62) CALLAN (T.) and HENDERSON (J. A. R.). — A new reagent for the colorimetric determination of minute amounts of copper. *Analyst* (G. B.), **54,** 650, 1929.
(63) FISCHER (H.) und LEOPOLDI (G.). — Nachweis und Bestimmung kleine Zingmengen mit Dithizon. *Z. anal. Chem.*, **107,** 241, 1937.

(63) ASSAF (A. G.) and HOLLIBAUGH (W. C.). — Determination of copper in mineral oils. Titrimetric extraction, using dithizone. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **12,** 695, 1940.

(63) HIGH (J. H.). — *Analyst* (GB), **72,** 60, 1947. (Cité par CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.). — Dosages colorimétriques. Masson et Cie éditeurs, Paris, 1952).

(64) PEYNAUD (E.). — Méthode colorimétrique de dosage du cuivre dans les vins à l'aide du 2,2-diquinolyle. *Chim. Analyt.*, **7,** 187, 1954.

(65) BRECKENRIDGE (J. G.), LEWIS (R. W.) and QUICK (L. A.). — *Ca. J. Research.*, **17,** 258, 1939.

(66) HOSTE (J.). — On a new copper specific group. Madedelingen Kon. *Vlaamsi Acad. Wetenschappen* (Belg.), **11,** 8, 1949. — *Anal. Chim. Acta*, **4,** 23, 1950.

(67) KUANG LU CHENG and BRAY (R. H.). — Two specific methode of copper determination in soils and plants. *Analyt. Chemistry*, **25,** 4, 655, 1953.

(67) COPPENET (M.), DUCET (G.), CALVEZ (J.) et BATS (J.). — Microdosage colorimétrique du cuivre dans les végétaux par la 2-2'diquinoléine. *Ann. I. N. R. A. Agron.*, **5,** 4, 597, 1954.

(68) RILEY (J. P.) and SINHASENI (P.). — The determination of copper in sea water, silicate rocks and biological materials. *Analyst* (G. B.),**83,** nº 986, 299, 1958.

(69) TANNER (H.) und RENTSCHLER (H.). — Der Polarograph als Hilfsmittel für Getränkeanalysen. II. Die quantitative polarographische Bestimmung von Kupfer in süssen und vergorenen Getränken. *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, **46,** 2, 209, 1955.

(70) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — Sur la présence de l'acide citrique dans la poire. Teneur comparative des moûts de poires en acides citrique et malique. *C. R. Acad. Sci.*, **226,** 1393, 1948.

(70) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — L'acidité organique des moûts de pommes et de poires. *Ind. Agric. Alim.*, 11-12, 513, 1949.

(70) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — Contribution à l'étude des principaux constituants des poires à poiré au cours de la croissance et de la maturation. *Ann. I. N. R. A. Technol.*, **3,** 3, 209, 1954.

(70) TAVERNIER (J.) et JACQUIN (P.). — Qualité des pommes et des poires en fonction des variétés. *Ann. Nutrit. Alim.*, **9,** 5-6, 143, 1955.

(70) JACQUIN (P.). — Le poiré. *Bull. Soc. Scient. Hyg. Alim.*, **43,** 7-8-9, 1955.

(70) JACQUIN (P.) et CHEREL (J.). — Évolution des principaux constituants de la poire à poiré au cours de la croissance du fruit. *Ann. I. N. R. A. Technol.*, **6,** 4, 429, 1957.

(71) JACQUIN (P.). — Le calcium et le magnésium dans les pommes et les poires et dans les produits cidricoles. *Ann. I. N. R. A.* Technol. **7,** 3, 229, 1958.

(72) WEBBER (H. F. P.), TAYLOR (L.) and MARSH (A. S.). — Observations on traces of copper in brewing, especially in relation to yeast. *J. Inst. Brewing*, **61,** 231, 1955.

(73) Extraits des travaux de la Commission d'Étude des Substances étrangères dans les Aliments. Rapport général présenté par le pharmacien général MASSY au nom de la Commission des Substances étrangères dans les aliments. *Ann. Falsif. Fraudes*, **43,** 499-501, 210, 1950.

(74) KOHN-ABREST (E.). — Le cuivre dans les aliments. *Ann. Falsif. Fraudes*, **43,** 499-501, 226, 1950.

(75) HALTER (P.). — Die Lagertanks aus glasfaserverstärkten Polyestern. *Schweiz. Zeitsch. Obst-Weinbau*, **67,** 6, 162, 1958.

L'ACIDE P. AMINOBENZOÏQUE, L'ACIDE PTÉROYLGLUTAMIQUE ET LA CHOLINE (VITAMINES DU GROUPE B) DANS LES VINS

PAR

Mme S. LAFON-LAFOURCADE et E. PEYNAUD

Station agronomique et œnologique, Bordeaux.

La présence dans les vins de huit vitamines principales du groupe B a déjà fait l'objet d'une série de publications personnelles, dont la bibliographie est donnée dans une étude d'ensemble. Pour compléter nos recherches dans ce domaine, nous réunissons en un seul exposé celles qui ont été conduites sur les teneurs des vins en acide p. aminobenzoïque (PAB), en acide ptéroylglutamique (ou acide folique) (PG) et en choline. Ces trois substances occupent une place secondaire dans la liste des vitamines B. Cependant le rôle de facteur de croissance de l'acide PAB vis-à-vis des bactéries lactiques ou de certaines levures, ses multiples actions pharmacologiques sur l'homme, l'importance de l'acide PG dans les synthèses des purines, des pyrimidines, de certains acides aminés, le rôle lipotropique de la choline, son activité de « donneur » du groupement méthyle, font que ces vitamines, moins bien connues, n'en sont pas moins indispensables. On a estimé que la ration humaine journalière, encore mal fixée, est voisine de 1 mg pour l'acide PAB et l'acide PG ; elle atteint 200 à 500 mg pour la choline (1).

Il existe très peu de documents relatifs aux taux de ces vitamines dans les vins, CASTOR (2) indique 38 µg et 81 µg par litre pour les teneurs respectives en acide PAB d'un moût et du vin correspondant ; l'acide PAB du moût augmente en effet rapidement durant la période de multiplication des levures ; par contre la choline tombe de 40 mg à 10 mg par litre durant la fermentation. L'acide PG a été déterminé par HALL et collaborateurs (3) comparativement sur les raisins, les moûts et les vins ; cette vitamine diminue considérablement au cours de la vinification et passe de 67 µg (chiffre moyen de dix dosages) par kg de raisin à 20 µg par litre de vin ; les vins rouges sont plus riches que les vins blancs.

Nous avons déterminé ces trois vitamines dans de nombreux moûts et vins. Nous avons suivi leur évolution au cours de la maturation des raisins et pour l'acide PAB et la choline au cours de la fermentation alcoolique ; l'acide PG est présent à doses si faibles que l'étude de son comportement présente peu d'intérêt. En outre les vins rouges se prêtent mal au dosage microbiologique des acides PAB et PG, les composés phénoliques inhibant plus ou moins la croissance des microorganismes-test mis en œuvre et d'autre part l'extraction quantitative de doses si faibles de vitamines s'étant avérée impossible (4).

Méthodes de dosage

Nous avons utilisé les techniques microbiologiques classiques. L'acide PAB est dosé avec la souche *Neurospora crassa p. aminobenzoicless* n° 1633, d'après la méthode de Tatum et Beadle (5). Le milieu de base indiqué par Connor Johnson (6), d'ailleurs très simple pour ce microorganisme peu exigeant, a été légèrement adapté ; il est le suivant par litre : saccharose, 30 g — acide tartrique, 8,2 g — ammoniaque 5 N, 15 cm³ — phosphate monopotassique, 5 g — sulfate de magnésium, 1 g — chlorure de sodium, 0,2 g — chlorure de calcium 0,2 g — perchlorure de fer, 10 mg — sulfate de zinc, 2 mg — biotine, 8 µg — cendres de levure de boulangerie, 5 g ; on amène à pH 5. La gamme étalon contient de 0 à 0,080 µg. Les échantillons de vins ou de moûts sont dilués au demi, amenés à pH 5 et dosés à quatre concentrations différentes. Les essais sont menés dans des erlenmeyers de 50 cm³ contenant 10 cm³ de liquide, dont 5 cm³ du milieu de base décrit. Après 72 heures d'incubation à 30°C, on recueille les mycéliums de *Neurospora*, on les presse sur papier-filtre, les roule en boule et les sèche 2 heures à 70°C. On pèse ensuite au demi-mg près.

La choline a été dosée sur le même principe à l'aide de la souche *Neurospora crassa cholineless* n° 34486, selon la méthode de Horowitz et Beadle (7). Le milieu de base utilisé est fourni par difco. La gamme étalon s'étend de 0 à 40 µg de choline ; les échantillons de moûts ou de vins sont dilués dix fois et dosés à quatre concentrations différentes. Il existe d'autres composés ayant la même activité physiologique que la choline et dosés avec elle (bétaïne, méthionine, monométhyléthanolamine) ; il serait donc plus correct de parler d'activité choline, cependant les teneurs en méthionine des moûts et des vins sont trop faibles pour interférer dans le dosage de la choline.

Pour déterminer l'acide PG, nous avons utilisé *Streptococcus lactis* R 8043, d'après Capps, Hobbs et Fox (8). La gamme étalon contient de 0 à 0,01 millième de µg par tube. Les vins sont dilués 10 fois, amenés à pH 5 et dosés à quatre concentrations différentes. Après 18 heures d'incubation à 35°C, on effectue une mesure néphélométrique.

Une hydrolyse acide préalable des moûts et des vins ne modifie pratiquement pas les résultats obtenus pour ces trois vitamines ; la fraction « combinée » est donc ici négligeable.

Évolution au cours de la maturation du raisin

Les dosages ont été effectués sur les échantillons de raisin Merlot et Cabernet-Sauvignon de la récolte 1957, prélevés périodiquement en cours de maturation, dans des vignobles du Bordelais, dans le but d'étudier par ailleurs les phénomènes de la maturation. Les dosages sont appliqués au jus d'écrasement des raisins.

Le tableau I donne un exemple de l'évolution de ces vitamines pendant la maturation du raisin.

TABLEAU I

Evolution des vitamines au cours de la maturation des raisins.

Teneurs par litre.

Dates des prélèvements	Sucres réducteurs g	Acide PAB µg	Acide PG µg	Choline mg
12 août	53	1,8	indosable	19
30 août	134	6,9	1,1	25
20 septembre	204	11,3	1,2	25
1 octobre	212	13,0	1,3	24
8 octobre	216	15,5	1,4	24

Le jus de raisin vert est déjà bien pourvu en choline, tandis qu'il est très pauvre en acides PAB et surtout PG, ce dernier étant à l'état de traces indosables. L'acide PAB s'élève considérablement en cours de maturation tandis que le taux de choline varie peu. Dans le moût de raisins mûrs, pour un grand nombre de dosages, les concentrations extrêmes

TABLEAU II

Teneurs en vitamines des moûts de raisins.

Teneurs par litre.

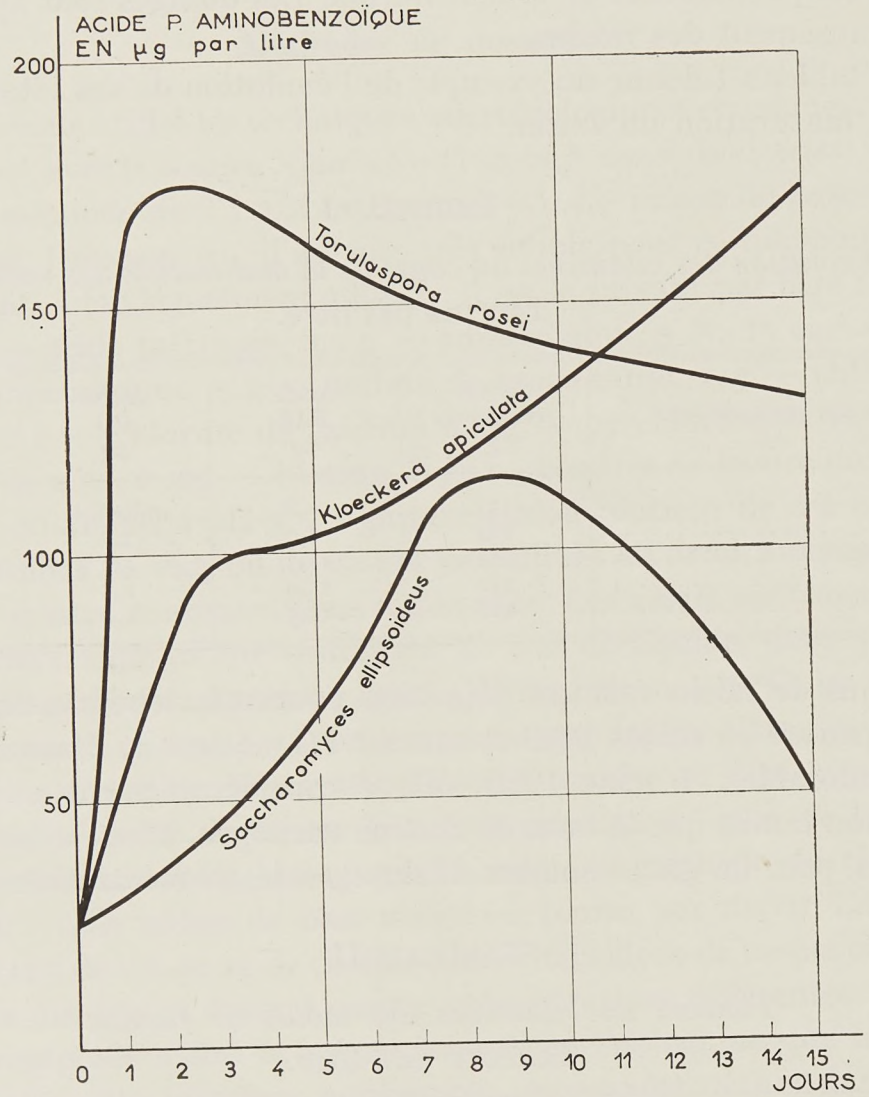
	Acide PAB µg	Acide PG µg	Choline mg
Cépage Merlot			
Pessac	92	1,0	39
Saint-Caprais	45	1,2	37
Margaux	53	1,5	32
Pauillac	15	1,2	24
Cépage Cabernet-Sauvignon			
Pessac	45	0,9	34
Saint-Caprais	47	0,9	27
Margaux	58	1,3	38
Pauillac	17	1,4	30

de ces vitamines sont de 13 à 39 mg par litre pour la choline, de 15 à 93 µg pour l'acide PAB et de 0,9 à 1,8 µg pour l'acide PG.

Le tableau II reproduit les teneurs vitaminiques de quelques moûts au moment de la vendange.

Évolution au cours de la fermentation alcoolique

Nous avons suivi le comportement de l'acide PAB et de la choline au cours de la fermentation d'un moût de raisin (12° Baumé) conduite



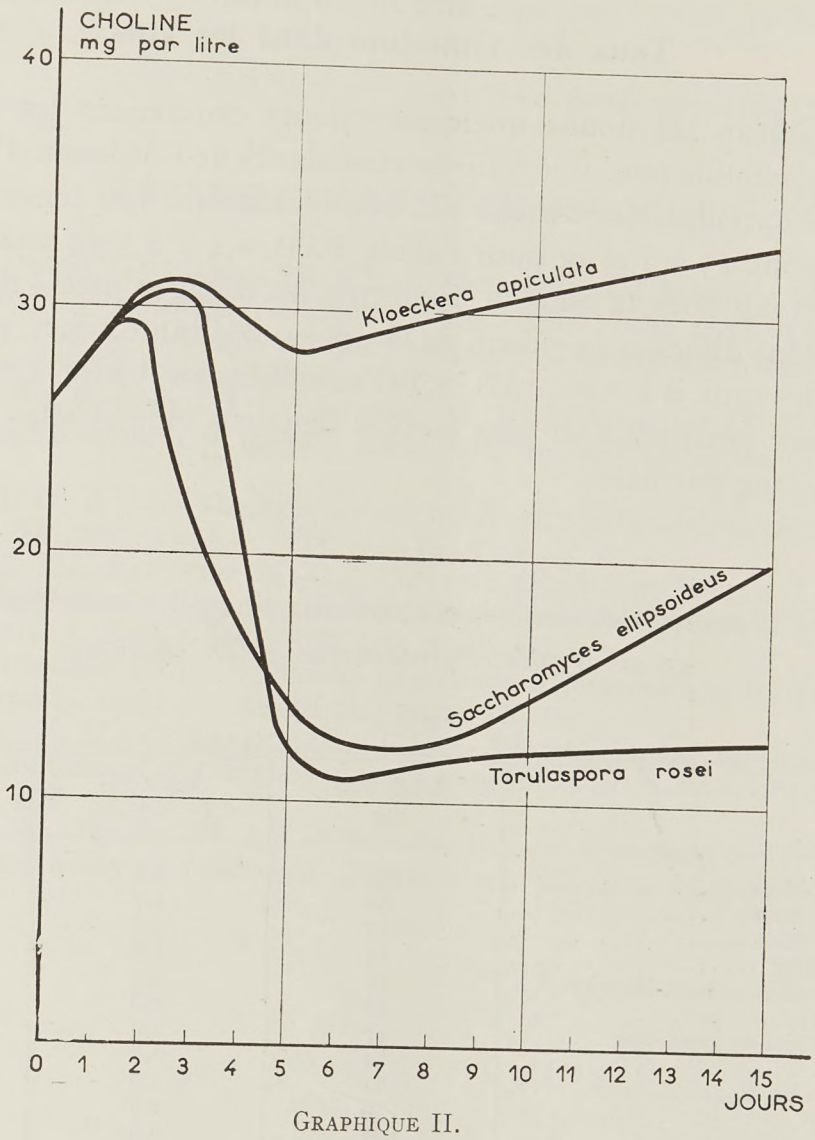
Graphique I.

avec trois levures de vin différentes : *Saccharomyces ellipsoideus*, *Kloeckera apiculata* et *Torulaspora rosei*. Les deux graphiques reproduisent les courbes de cette évolution.

Dans la première phase de la fermentation, on observe une synthèse considérable d'acide PAB par les levures. *Torulaspora rosei* notamment fait passer en 48 heures la teneur de 25 µg à 175 µg par litre. Vers la fin de la fermentation, au contraire, les levures, et c'est surtout le cas pour *Saccha-*

romyces ellipsoideus, consomment de l'acide PAB. Seule *Kloeckera apiculata* se signale par une formation continue de cette vitamine.

Pour la choline, après une augmentation de quelques mg au départ de la fermentation (par hydrolyse de formes combinées?), on assiste à une très forte consommation, la teneur dans le vin tombant aux deux tiers de la dose du moût d'origine. Pour les levures apiculées, la consommation



GRAPHIQUE II.

est faible. La concentration en choline s'élève par la suite nettement en fin de fermentation, vraisemblablement par autolyse des levures.

Dans une autre série d'expériences, nous avons dosé ces vitamines dans un moût de raisin et dans le même moût fermenté par différentes souches de levures. Seules les cultures de levures très oxydatives, formant des voiles, telles que *Hansenula anomala* et *Pichia fermentans*, conduisent à une perte sensible de vitamines. Par contre *Kloeckera magna*, *Torulopsis bacillaris*, *Candida pulcherrima* donnent les synthèses les plus élevées.

Dans la pratique, la fermentation alcoolique du moût qui est surtout

le fait de levures du type *Saccharomyces*, se solde par une très légère consommation de choline, et par un gain peu important d'acide PAB. L'acide PG, en quantité toujours très faible, ne subit pas de variation. Ici encore on remarque que la fermentation n'épuise pas le milieu en vitamines, et les vins obtenus présentent des richesses vitaminiques au moins égales ou légèrement supérieures à celles des moûts.

Taux des vitamines dans les vins

Le tableau III donne quelques valeurs concernant les acides PAB et PG et la choline pour une série de vins blancs de Bordeaux d'âges divers, livrés en bouteilles, donc prêts à la consommation. Les teneurs extrêmes par litre sont 15 à 133 µg pour l'acide PAB, 0,4 à 4,5 µg pour l'acide PG et 19 à 27 mg pour la choline. Bien que les dosages précis dans les vins rouges soient difficiles en raison de la présence d'inhibiteurs, on peut estimer que les taux d'acides PAB et PG sont de même ordre. Les teneurs en choline sont généralement plus élevées dans ces vins et elles peuvent atteindre 43 mg par litre.

TABLEAU III

Teneurs des vins blancs en acide p. aminobenzoïque, en acide ptéroylglutamique et en choline.

Teneurs par litre.

	Acide PAB µg	Acide PG µg	Choline mg
Entre-Deux-Mers	133	3,3	20
Entre-Deux-Mers	60	4,5	21
Entre-Deux-Mers	115	4,5	19
Côtes de Bourg	15	1,8	19
Côtes de Bordeaux-Saint-Macaire	51	3,5	19
Graves	48	0,8	—
Premières côtes de Bordeaux	47	2,9	24
Loupiac	24	0,8	22
Sainte-Croix-du-Mont	24	2,0	19
Barsac 1950	39	0,4	19
Barsac 1953	120	0,9	—
Barsac 1955	52	2,4	20
Sauternes 1947	41	3,5	26
Sauternes 1950	51	1,0	—
Sauternes 1955	116	3,1	27

Résumé

Les moûts de raisins mûrs contiennent en moyenne par litre 51 µg d'acide p. aminobenzoïque, 1,2 µg d'acide ptéroylglutamique et 26 mg de choline. Malgré d'importantes différences de comportement des diverses espèces de levures, la fermentation alcoolique modifie peu ces taux

moyens dans la pratique. En effet les valeurs moyennes relevées sur une trentaine de vins de Bordeaux sont de 67 µg pour l'acide p. aminobenzoïque et 2 µg pour l'acide ptéroylglutamique. On a trouvé en moyenne 21 mg de choline dans les vins blancs et 29 mg dans les vins rouges.

Une légère synthèse des deux premières vitamines compense la petite consommation de choline par la levure. Finalement, on remarque qu'ici encore, pour ces trois vitamines du groupe B, la vinification respecte parfaitement la richesse vitaminique du raisin et que le vin est aussi riche que le moût.

Reçu pour publication le 25 mai 1958

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SEBRELL (W. H.) et HARRIS (R. S.). — *The vitamins. Chemistry, physiology, pathology*. 3 volumes. Academic Press, New-York, 1954.
(2) CASTOR (J. G. B.). — The B-complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. *Applied. Microb.*, **1**, 97, 1953.
(3) HALL (A. P.), BRINNER (L.), AMERINE (M. A.) et MORGAN (A. F.). — The B vitamins content of grapes, musts and wines. *Food Research*, **21**, 362, 1956.
(4) CASTOR (J. G. B.). — The free amino acids of musts and wines *Food Research*, **18**, 139, 1953.
(5) TATUM (E. L.), RITCHTE (M. G.), COWDRY (E. V.) et WICKS (L. F.). — Vitamin content of mouse epidermis during methyl chloranthrene carcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, **163**, 675, 1946.
(6) CONNOR JOHNSON (B.). — *Methods of vitamin determination*. Burgess Pub., Minneapolis, 1949.
(7) HOROWITZ (N. H.) et BEADLE (G. W.). — Microbiological method for the determination of choline by use of a mutant of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, **150**, 325, 1943.
(8) CAPPS (B. F.), HOBBS (H. L.) et FOX (S. H.). — A method for the microbiological assay of folic acid. *Journ. Bact.*, **55**, 869, 1948.

ÉVOLUTION DES PECTINES DANS LES BOISSONS ET PRODUCTION DU MÉTHANOL

PAR

M. FLANZY et Mᵉˡˡᵉ Y. LOISEL

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne.

PLAN DU MEMOIRE

I. — Généralités.
II. — Méthodes de dosage des pectines.
III. — Le méthanol dans les moûts de raisin et les vins.
Méthodes de dosage.
Mode opératoire.
IV. — Résultats obtenus.
Interprétation des résultats.
Influence de la macération.
V. — Conclusion.

I. — GENERALITES

Il ne fait aucun doute aujourd'hui que les pectines participent à la genèse du méthanol trouvé dans les dérivés des végétaux, mais les relations entre ces deux corps n'ont pas été systématiquement étudiées. Cette lacune est en partie comblée par les résultats apportés par les travaux qui font l'objet du présent mémoire, et par d'autres qui feront l'objet d'une publication différente (1).

Pour une meilleure compréhension du texte, un rappel des connaissances générales sur les pectines nous paraît utile.

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, les limites du terme « matières pectiques » ne sont pas encore exactement définies. Aussi la nomenclature adoptée conduit-elle parfois à des confusions. Il est vrai que l'hétérogénéité de ces substances entre pour une large part dans l'incertitude de leurs définitions.

On s'accorde pour grouper sous le nom de « matières pectiques » des colloïdes dérivés d'hydrates de carbone et ayant la propriété fondamen-

(1) M. FLANZY et BOUZIGUES (Mᵐᵉ L.). — « Pectines et Alcool Méthylique ». En cours de rédaction.

tale de donner des « gels » dans certaines conditions de concentration. Elles ne constituent donc pas des solutions vraies.

Pour V. GRIGNARD (20), les pectines, sous l'action de la potasse, donnent le sel de potassium d'un acide avec départ d'alcool méthylique. Cet acide serait l'ancien acide pectique de BRACONNOT et FREMY.

Il est intéressant de rapprocher les résultats analytiques de BRACONNOT (6) concernant la composition du pectate de K, la dose de méthanol et les résultats obtenus par l'un de nous sur la composition du pectate de Ca (38) et la quantité de méthanol.

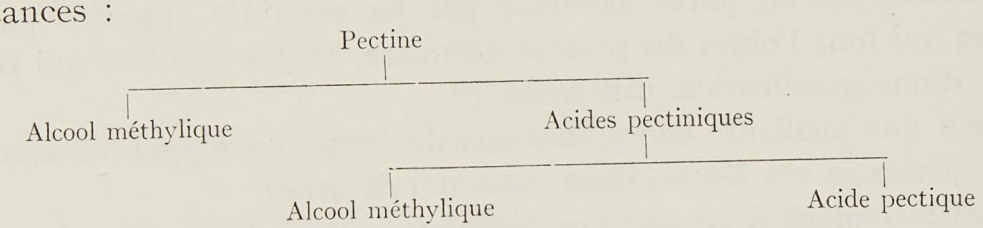
Le calcul montre qu'aux erreurs opératoires près, ces résultats doivent être considérés comme identiques. Cela signifie que l'acide pectique tel qu'il résulte de l'action d'une base alcaline ou alcalino-terreuse est une molécule bien définie. On sait à présent que cette molécule contient fondamentalement un noyau d'acide polygalacturonique (tétra d'après certains).

KERTESZ (26) donne des précisions intéressantes. Cet auteur désigne sous le nom *d'acides pectiniques* les acides polygalacturoniques colloïdaux qui contiennent une proportion non négligeable de groupements méthylester. Ces acides pectiniques, dans des conditions appropriées, peuvent former des gels avec le sucre ou les acides, ou, si les groupements méthyl sont peu nombreux, avec certains ions métalliques. Les sels des acides pectiniques sont des pectinates neutres ou acides.

Il désigne enfin par le terme *acide pectique* les acides polygalacturoniques colloïdaux essentiellement non méthylés. Les sels de ces acides sont des pectates neutres ou acides.

La pectine apparaît ainsi dans une première approximation comme un composé plus méthoxylé que l'acide pectinique qui l'est davantage que l'acide pectique.

On peut même schématiser comme suit la filiation de ces diverses substances :



Mais le passage de la pectine à l'acide pectique n'est pas seulement une déméthoxylation totale avec acidification correspondante de la molécule. Déjà l'un de nous avait constaté en 1927 que l'hydrolyse alcaline conduisait à une production d'arabinose. (38).

L'action de la pectinase ou « polygalacturonase » précise davantage encore cette hydrolyse. On a constaté une limitation de cette activité hydrolysante, alors que l'hydrolyse alcaline se poursuit jusqu'à la déméthoxylation totale. On peut donc émettre l'hypothèse que dans une

première phase la pectinase ne déméthoxyle que partiellement la pectine et cela dès l'expression du jus. Mais en même temps il y aurait production d'arabinose et de galactose.

En toute logique, on peut penser que cette première phase correspond au passage de la pectine à l'acide pectinique.

S'il est bien acquis aujourd'hui que les pectines comprennent essentiellement une chaîne polygalacturonique partiellement estérifiée par le méthanol, la proportion estérifiée varierait avec l'origine de la pectine. Par ailleurs, sur cet ensemble polygalacturonique, seraient fixées des molécules d'arabinose et de galactose, ce qui est généralement admis. Mais ce qui l'est moins, c'est la présence d'autres molécules telles que celle de l'acide glycérophosphorique, et de cations tels que le Calcium par exemple. L'existence de cendres alcalines à partir de la pectine purifiée est une preuve de la présence de cations.

Il est important de souligner que la déméthoxylation, soit par voie enzymatique, soit par voie acide, se fait avec augmentation de l'acidité du composé pectique. Ce phénomène sera repris quand on discutera de la méthode de dosage des pectines.

Enfin, il n'est pas invraisemblable de penser que la succession des opérations qui marquent l'extraction et le dosage des pectines provoque des hydrolyses, des « désalifications » indéterminées. La molécule pectique se trouverait ainsi défigurée, puisque, de proche en proche, on aboutirait à partir d'une molécule très complexe, à un noyau polygalacturonique. Il s'agit donc de savoir si l'on ne doit pas considérer comme constituants normaux de la pectine les éléments naturellement liés à ce noyau mais progressivement éliminés. Le problème reste entier.

Le présent travail, s'intéressant à la production de méthanol à partir des pectines au cours de la fermentation alcoolique des jus de raisins, ne traite donc qu'une partie du problème général que nous venons de poser. Des travaux ultérieurs préciseront le moment de production des autres produits d'hydrolyse des pectines.

Mais le dosage préalable des pectines est à lui seul un problème fort délicat. Aussi fait-il l'objet d'un chapitre particulier.

II. — METHODES DE DOSAGE DES PECTINES

Le désaccord est assez général sur le choix de la méthode. Le fait n'est pas surprenant, puisque les pectines ne sont pas encore rigoureusement définies, et qu'elles sont peut-être des mélanges variables d'une espèce végétale à une autre, et même d'un moment à l'autre de la vie du fruit.

Dans l'état actuel des choses, les procédés de dosage proposés se divisent en trois groupes :

a) décarboxylation par l'acide chlorhydrique de la pectine isolée, et dosage du gaz carbonique produit (LEFEVRE et TOLLENS) (26) (40).

b) précipitation de la pectine sous forme de pectate de calcium après déméthylation à la soude (Méthode CARRE et HAYNES, originale (8) ou modifiée par SEMICHON-FLANZY (38).

c) précipitation de la pectine par l'alcool et dosage par acidimétrie après redissolution dans l'eau distillée (33).

La décarboxylation mesure évidemment les fonctions CO_2 H estérifiées ou salifiées ou libres (s'il y en a). Il ne faut donc pas voir dans cette production de CO_2 une marque de l'acidité de la pectine.

La technique de précipitation sous forme de pectate de calcium aboutit à un sel défini, ainsi que nous l'avons remarqué plus haut. A ce titre elle est peut-être la plus rigoureuse. C'est la technique utilisée pour les travaux cités au début du mémoire et dont le mémoire est en cours de rédaction.

La troisième technique par précipitation alcoolique de la pectine et dosage dit de l'acide pectique libre et estérifié, simple par son application, est en réalité fort délicate pour l'interprétation des résultats. Il ne faut pas oublier en effet le phénomène de déméthoxylation qui conduit de l'acide pectinique à l'acide pectique en étapes plus ou moins nettes. C'est pourtant la technique que nous avons utilisée, mais en tenant compte de certaines observations.

JAKOVLIV (24) fait remarquer que, dans cette technique de précipitation à l'alcool, la durée du repos doit être précisée et réduite au minimum, afin d'éviter une déméthoxylation de la pectine précipitée. Ce sont les conditions réalisées par SEMICHON-FLANZY. Par contre, dans les conditions énoncées par PEYNAUD (33), le milieu alcoolique peut avoir un pH élevé (voisin de 1,5 à 2) et déterminer à 20 ou 25° C et en plusieurs jours une désestérification marquée. Cette désestérification dans le temps nous a amenés à étudier la vitesse d'hydrolyse de la pectine en fonction du pH, de la température et de la durée de repos. Les résultats obtenus feront l'objet d'un mémoire ultérieur. Notons toutefois que, tenant compte de ces résultats, nous avons opéré à 8-10°C. la durée du repos étant limitée à 24 heures.

Mode opératoire.

La technique de précipitation adoptée, par l'alcool en milieu chlorhydrique, est celle de SEMICHON-FLANZY (38). Le titrage acidimétrique final est conduit suivant PEYNAUD (33).

La prise d'essai varie de 100 à 500 ml. Après centrifugation légère (et non filtration), on acidifie par l'acide chlorhydrique au 1/2, dans la proportion de 5 ml d'acide dilué pour 100 ml de moût. Puis on amène

à un titre alcoolique de 80° par addition d'alcool à 96° ou d'alcool absolu. On agite et abandonne au repos pendant 24 heures à une température de 8-10°C. Le précipité recueilli par centrifugation est lavé 3 fois par 40 à 50 ml d'alcool à 80°, toujours par centrifugation. On redissout dans 50 ml d'eau distillée bouillie tiède et précipite à nouveau par addition de 200 ml d'alcool absolu ou 250 ml d'alcool à 96°. On laisse reposer 24 heures à 8-10°C et recueille le précipité par centrifugation. Après lavage à l'alcool à 80° jusqu'à élimination complète des chlorures, on dissout dans l'eau distillée tiède puis le volume est amené à 100 ml.

Sur 50 ml de cette solution aqueuse, on dose l'extrait sec et les matières minérales.

Sur les 50 ml restants, on titre l'acidité à la soude N/20 en présence de phénolphtaléine. On obtient ainsi le taux d'acide pectique libre (milliéquivalent d'acide pectique = 176 mg). On hydrolyse ensuite en ajoutant à la liqueur 25 ml de soude N/20 ; on agite et laisse en contact 3 heures au moins à température ambiante. On neutralise alors par 25 ml d'acide sulfurique N/20 et titre en retour par la soude N/20. On obtient ainsi le taux d'acide pectinique (milliéquivalent d'acide pectinique = 190 mg).

Ce liquide est ensuite concentré et on y dose l'azote par la méthode de KJELDAHL. On obtient ainsi le taux de protéins entraînéees par la précipitation à l'alcool.

On calcule ensuite :

Matières pectiques totales = Extrait sec — (protéines + matières minérales).

Pectine = Acide pectique + acide pectinique + méthanol.

III. — LE METHANOL DANS LES MOUTS DE RAISIN ET LES VINS

L'ubiquité de l'alcool méthylique dans les boissons alcooliques et les vins en particulier n'est plus à démontrer (14-15-16-19-27).

D'après G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN (3,4), non seulement le méthanol existerait dans les vins, mais encore il y aurait une relation entre la teneur en cet alcool et le bouquet des vins.

1° Méthodes de dosage.

Les méthodes proposées sont variées. L'un de nous (14-15-16) a mis au point en 1934 une technique de dosage du méthanol en présence d'éthanol et de ses homologues, basée sur l'ioduration des alcools primaires suivie de leur régénération par l'acétate d'argent et oxydation des alcools régénérés. Il s'agit là d'une méthode pondérale et volumétrique finalement spécifique. DENIGES (12) le dose par oxydation permanganique ménagée en méthanal, puis caractérisation de ce dernier par une réac-

tion colorée appropriée (réactif de SCHIFF). Dans toutes les techniques qui en dérivent, les réactifs choisis pour caractériser le méthanol sont la fuchsine bisulfitée, le chlorhydrate de phénylhydrazine, et surtout l'acide chromotropique (30), et encore mieux le sel de Sodium de cet acide (5).

Pour les diverses raisons exposées par Mme BOUZIGUES, nous avons adopté le mode opératoire décrit par celle-ci : oxydation permanganique ménagée et examen photocolorimétrique de la coloration formée avec le sel de Na de l'acide chromotropique.

2° Mode opératoire.

Il tient compte des remarques suivantes : (30).

— Pour que la coloration donnée avec l'acide chromotropique se développe, il est nécessaire de chauffer. Les auteurs ne sont pas d'accord sur la température à atteindre. Certains travaillent à 60°C, d'autres à 100°C. Suivant NOVELLI, en opérant à 70°C (±2°C), on obtient des résultats constants.

— L'intensité de la coloration augmente avec la durée de chauffage. Il est donc nécessaire de bien définir celle-ci pour obtenir des résultats comparables. On l'a limitée arbitrairement à une heure.

— Le réactif est constitué par une solution du sel de sodium de l'acide chromotropique dans $SO_4\ H_2$ à 75 p. 100. Quand on mélange ce réactif avec le liquide alcoolique d'essai, il faut éviter toute élévation locale de température, car il se produirait des colorations jaunes qui fausseraient la lecture colorimétrique ultérieure.

Le mode opératoire adopté est le suivant :

a) *Dans le cas du vin* on distille une prise d'essai de 50 ml et recueille 80 p. 100 de ce volume (soit 40 ml). On détermine le degré alcoolique du distillat par oxydation chromique, et ajuste à 2°,5, tenant compte du résultat de ce dosage. On opère ensuite dans de petits tubes bouchés émeri.

A 1 ml de la dilution précédente, on ajoute 0,6 ml de $PO_4\ H_3$ N/1, et porte au bain-marie à 35°C. La solution permanganique à 3 p. 100 est également amenée à cette température. On ajoute dans le tube émeri 0,8 ml de MnO_4K à 3 p. 100 et laisse l'oxydation se poursuivre pendant 20 minutes toujours à 35°C. L'excès de $Mn\ O_4\ K$ est détruit par addition de 0,3 ml de $SO_4\ H_2$ à 20 p. 100 en volumes. Le contenu du tube doit être *incolore*. On porte dans l'eau glacée le tube à réaction et le sel de sodium de l'acide chromotropique. Quand l'équilibre des températures est réalisé on ajoute 5 ml de réactif chromotropique, goutte à goutte et en évitant toute élévation de température. Le milieu à ce stade doit être incolore. On porte 1 heure au bain-marie, à 70°C (± 2°C). Après refroidisse-

ment sous l'eau courante, on lit au photocolorimètre (Absorption 560-600 mμ).

Un essai à blanc est conduit parallèlement sur une solution aqueuse d'alcool éthylique à 2°,5.

La quantité de méthanol est facilement déduite de la courbe d'étalonnage.

b) *Dans le cas du moût*, le procédé est légèrement modifié comme suit :

1° Pour éviter la caramélisation en cours de chauffage, on ajoute 20 ml d'eau à la prise d'essai, et on interpose entre le ballon et la flamme une calotte d'amiante. On recueille 80 p. 100 du volume total de la prise d'essai, soit 56 ml.

2° On ajoute au distillat 2,5 p. 100 d'alcool éthylique pur, pour se placer dans les mêmes conditions analytiques que pour le vin (On suppose que le distillat est exempt de quantités appréciables d'alcool).

Le reste du dosage est conduit comme pour le vin.

IV. — RESULTATS OBTENUS

Nos travaux ont été effectués sur des moûts et les vins correspondants obtenus à partir de 4 cépages du domaine de Pech-Rouge. Chaque moût est un échantillon moyen recueilli à la cave après une demi-journée de vendange, portant sur un cépage pur.

Une partie de chaque moût a été utilisée pour les diverses déterminations, le reste mis en fermentation sans sulfitage préalable. La fermentation s'est déroulée normalement et a duré en moyenne 8 à 10 jours.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau I.

TABLEAU I

Moûts	Sucres g °/₀₀	Acidité g °/₀₀	Extrait sec	Matières pectiques en mg °/₀₀				Méthanol mg °/₀₀
				Totales	Acide pectique	Acide pectinique	Pectine	
Carignan blanc . .	172	5,7	688	642	108	493	669	68
Hybride blanc . . .	174	5,0	709	688	114	558	730	58
Aramon	143	6,0	401	389	88	292	452	72
Carignan rouge . .	186	5,9	866	846	150	674	913	89

Vins correspondants	Degré alcool	Acidité g °/₀₀	Extrait sec	Matières pectiques en mg °/₀₀				Méthanol mg °/₀₀
				Totales	Acide pectique	Acide pectinique	Pectine	
Carignan blanc . .	9°90	5,5	409	384	68	300	442	74
Hybride blanc . . .	10°10	4,6	388	360	65	284	412	63
Aramon	8°20	5,10	214	198	42	130	251	79
Carignan rouge . .	10°30	5,20	541	522	98	403	594	93

INTERPRETATION DES RESULTATS

Nos résultats appellent les remarques suivantes :

1° Le taux de pectine diminue quand on passe du moût au vin correspondant. Par conséquent, la pectine disparaît de la phase hydro-alcoolique pendant la fermentation. Suivant SEMICHON, cette disparition est d'autant plus accentuée que la fermentation est plus active et la quantité de levures produites plus importante (37). PEYNAUD (34) remarque également cette diminution brutale pendant la fermentation. Selon cet auteur, l'acide pectique, insoluble, forme une partie de l'écume qu'on observe en moût clair. Il ne serait pas impossible également que les levures provoquent un clivage de la molécule d'acide polygalacturonique et sa décarboxylation, conduisant à des osanes.

On peut expliquer cette diminution du taux de pectines quand on passe du moût au vin :

a) par l'enrichissement progressif du milieu en alcool qui insolubilise la pectine ;

b) par une précipitation directe et naturelle de pectate de calcium sous l'influence des ions Ca^{++} présents dans le moût en fermentation.

2° Nos résultats sont plus élevés que ceux trouvés par PEYNAUD pour des cépages bordelais (34).

Ceci peut s'expliquer, ainsi que le fait JACQUIN pour les pommes (22) par le fait que le taux de pectines varie d'un cépage à l'autre, et pour un même cépage d'une année à l'autre.

D'autre part, nos vins et ceux étudiés par PEYNAUD ont des degrés alcooliques différents ; un degré alcoolique élevé s'accompagnant d'une précipitation de pectine plus abondante pendant la fermentation, il devient logique que nos résultats diffèrent de ceux de PEYNAUD.

3° Une certaine quantité de méthanol est déjà présente dans le moût avant toute fermentation. Il conviendrait d'étudier ici l'action de la pectine-méthylestérase, ce que nous nous proposons de faire dans un travail ultérieur.

4° Pendant la fermentation, il y a déméthoxylation de la pectine et production de méthanol. Les différences constatées, quoique faibles, sont toutes positives.

INFLUENCE DE LA MACERATION

Nous avons préparé un moût de Carignan, par pressurage à la presse à main. Ce moût a été mis à macérer à 0°C en présence de pellicules, pépins, rafles. Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau II.

On constate que, pendant la macération, le taux de pectine augmente

rapidement puis diminue, tout en restant supérieur à ce qu'il était avant macération. Le taux de mathénol augmente dans des proportions beaucoup plus importantes.

TABLEAU II

	Acidité en g °/₀₀	Matières pectiques en mg °/₀₀				Méthanol mg °/₀₀
		Matières pectiques totales	Acide pectique	Acide pectinique	Pectine	
Moût avant macération..	4,3	1 182	207	849	1 120	64
Moût macéré 6 jours....	3,9	1 439	291	1 101	1 474	82
Moût macéré 9 jours....	3,5	1 256	266	935	1 290	89
Moût macéré 12 jours...	3,4	1 238	275	919	1 291	97

V. — CONCLUSION

Nous avons étudié la variation des taux de pectines et de méthanol dans 4 moûts de raisin et les 4 vins correspondants. Nous avons également envisagé l'influence de la macération sur les taux de pectine et de méthanol.

Nos constatations sont les suivantes :

1° Le taux de pectine diminue notablement quand on passe d'un moût au vin correspondant. La fermentation semble insolubiliser la pectine.

2° Une certaine quantité de méthanol est déjà présente dans le moût, avant toute fermentation. Pendant la fermentation, il y a enrichissement relativement faible, mais certain, en méthanol.

3° Par macération totale (pulpe, rafle, pellicule, pépins) de 12 jours à 0°C, nous avons obtenu une augmentation nette du taux de méthanol, et une augmentation un peu moins nette du taux de pectines.

Reçu pour publication le 25 juillet 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) BEAUQUESNE (L.). — Les substances polyuroniques (gommes, mucilages, pectines, pseudo-celluloses). *Ann. Pharmaceutiques*, **4**, 271, 1946.

(2) BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — Méthode améliorée de recherche et de dosage de petites quantités de méthanol. *Ann. Inst. Pasteur*, **74**, 1, 234, 1948.

(3) BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — Sur la teneur des vins en alcool méthylique ou méthanol. *C. R. Ac. Agr.*, **36**, 59, 1950.

(4) BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.). — Recherches sur le méthanol dans le vin. *Ann. Techn. I. N. R. A.*, série E, 205, 1952. *Ind. Agr. Alim.*, 311, 1952.

(5) BOUZIGUES (Mme L.). — Sur le dosage du méthanol en présence d'éthanol par électrophotométrie. *Ann. Techn. I. N. R. A.*, série E, 223, 1955.

(6) BRACONNOT (H.). — Recherches sur un nouvel acide universellement répandu dans tous les végétaux. *Ann. Chim. Phys.*, série 2, **28,** 173, 1825.

(7) BRACONNOT (H.). — Nouvelles observations sur l'acide pectique. *Ann. Chim. Phys.*, série **2, 30,** 96, 1825.

(8) CARRÉ (H.) et HAYNES (D.). — The estimation of pectin as calcium pectate, and the application of this method to the determination of the soluble pectin in apples. *Bioch. J.*, **16,** 60, 1922.

(9) CERUTTI (G.). — Sur l'origine et la teneur en méthanol des vins italiens. *Ann. della Sper. Agr.*, **V,** nº 2, 1951, Rome.

(10) COLIN (H.) et LEMOYNE (S.). — Recherche et dosage des matières pectiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20,** 343, 1938.

(11) DOREE (Ch.). — Les méthodes de la Chimie de la cellulose. Dunod éd., 1949.

(12) DENIGES (G.). — Recherche de traces de méthanol en présence d'éthanol par la fuchsine bisulfitée. *C. R. Ac. Sc.*, **150,** 2, 529, 1910.
— Recherche de l'alcool méthylique en général et spécialement en présence de l'alcool éthylique. *C. R. Ac. Sc.*, **150,** 3, 852, 1910.

(13) ECHEVIN. — L'évolution du complexe pecto-cellulosique dans les fruits conservés par le froid, **213,** 458, 1941.

(14) FLANZY (M.). — L'alcool méthylique dans les liquides alcooliques naturels. Thèse Sciences Toulouse, 1954.

(15) FLANZY (M.). — L'alcool méthylique dans les milieux naturels. *Ann. Fals. Fraudes,* **27,** 554, 1934.

(16) FLANZY (M.). — Nouvelle méthode de dosage de faibles quantités d'alcool méthylique en présence d'alcool éthylique et de ses homologues en quantités très importantes. *Ann. Fals. Fraudes,* **28,** 260, 1935.

(17) FRANCOT (P.) et GEOFFROY (P.). — Les pectines et les gommes dans les moûts et les vins de Champagne. *Bull. Interna. Vins,* **242,** 94, 1951.

(18) FRANCOT (P.) et GEOFFROY (P.). — Le méthanol dans les Jus de Fruits, les boissons fermentées, les alcools et les spiritueux. *Rev. Belge Ferm. et Ind. Alim.*, **XI,** 6, 279, 1956.

(19) FROLOV-BAGREEV et AGABALIANTZ. — Chimie du Vin 1951.

(20) GRIGNARD (V.). — Traité de Chimie Organique. Tome I, p. 339-340, 1935; tome VIII, fasc. 2, p. 715-716, 1938.

(21) GUYMON (J. F.). — Report on methanol. *J. Of. Ass. Off. Agr. Chemists,* 310-328, 1951.

(22) JACQUIN (P.). — Pectine méthylesterase et matières pectiques dans la pomme et la poire. Leur importance dans la fabrication des cidres et poirés. *Ann. I. N. R. A.*, série E, 67, 1955.

(23) JACQUIN (P.) et TAVERNIER (J.). — Microdosage colorimétrique du méthanol. Application de la méthode aux cidres et eaux-de-vie de cidre. *Ann. I. N. R. A.*, série E, 113, 1953.

(24) JAKOVLIV. — Réflexions sur les méthodes d'appréciation de la teneur en pectines des fruits. *Ind. Agr. et Alim.*, 317, 1952.

(25) JOUX (J. L.). — Rôle des substances pectiques dans le maintien de la fermeté des abricots appertisés. Thèse Conservatoire National A. et M. 1957.

(26) KERTESZ (Z. I.). — The pectic substances. Interscience Publishers New-York, I. N. Y., 1951.

(27) KOHN-ABREST (E.). — Enquête sur l'origine de l'alcool méthylique dans le corps humain. *Ann. Fals. Fraudes,* 55, 1957.

(28) LE CORVAISER (H.). — Sur la composition et le dosage des pectines industrielles. *Chimie et Industrie,* 545, 1947.

(29) MUNTZ et LAINE. — Les matières pectiques dans le raisin et leur rôle dans la qualité des vins. *Ann. Brass.*, **9,** 157, 1906.

(30) Novelli (A.). — Tecnica sencilla para la determinacion de alcohol metilico en alcohol etilico. *Ann. Dir. Nac. Quim.* (Argentine), **84**, 1950.
(31) Peynaud (E.). — Sur la composition chimique des pêches. *Ann. I. N. R. A.*, Série A, 775, 1950.
(32) Peynaud (E.). — Sur la composition chimique des prunes. *Ann.I. N. R. A.*, série A, 51, 1951.
(33). Peynaud (E). — Sur les matières pectiques des fruits. *Ind. Agr. et Alim.*,609, 1951.
(34) Peynaud (E.). — Sur les matières pectiques des moûts de raisin et des vins. *Ann. Fals. fraudes*, 51e, 11, 1952.
(35) Postlmayer, Luth and Leonard. — Characterisation of pectin changes in freestone and clingstone peaches during ripennig and processing. *Food Techn. U. S. A.*, nº 12, 618, 1956.
(36) Ali Sadjadi. — Dosage des matières pectiques dans les vins. Thèse Bordeaux, 1936.
(37) Semichon (L.). — Les pectines des raisins et le moelleux des vins. *Chimie et Industrie*, 17, nº 1, 25, 1927.
(38) Semichon (L.) et Flanzy (M.). — Sur la constitution et le dosage des pectines et des gommes dans les vins et les moûts de raisin. *Ann. Fals. Fraudes*, nº 223, 395, 1927.
(39) Storto (T.). — Su un nuovo metodo di valutazione delle pectine. *Ind. Ital. Conserve*, nº 1, 7, 1951.
(40) Ulrich (R.). — La vie des Fruits. Masson éd., 1952.

LES ACIDITÉS DU VIN ET LEUR TITRATION

PAR

J. CARLES, Melle M. LAMAZOU-BETBEDER, Mme R. PECH
et Mme S. SCHIAVON

Station d'Agronomie et d'Oenologie de Toulouse
et Laboratoire de Physiologie végétale de l'Institut Catholique de Toulouse

PLAN DU MEMOIRE

I. — **Définition des acidités.**
II. — **Observations sur le dosage de l'acidité organique.**
Difficultés inhérentes au dosage.
Principe et application d'une nouvelle méthode.
III. — **Facteurs correctifs.**
Volume et pH choisis.
Acides minéraux.
Acides organiques.
IV. — **Méthode de dosage proposée.**
Mode opératoire.
Remarques.
V. — **Conclusion.**

I. — DEFINITION DES ACIDITES

Le vin est un liquide si riche en acides divers d'inégale importance, organiques ou minéraux, fixes ou volatils, que le mot d'acidité demande ici de multiples précisions.

Laissant délibérément de côté la question, déjà étudiée (2), des formes sous lesquelles les acides organiques existent dans les vins, ou les problèmes que pose le dosage de chacun de ces acides ou bien leur séparation en acides volatils et en acides fixes, nous voudrions considérer l'acidité globale et déterminer dans cette acidité la part qui revient aux acides organiques et la proportion de ces acides existant sous forme d'acides libres.

Nous distinguons quatre notions différentes, quatre types d'acidité mesurables :

— l'acidité vraie ou ionique,

— l'acidité potentielle ou de titration,

— l'acidité organique libre,

— l'acidité organique totale.

Un certain flottement dans les méthodes de dosage ne provient-il pas de ce qu'on n'aurait pas suffisamment distingué ces acidités ou tout au moins leur expression?

Les deux premières notions, acidité vraie et acidité de titration, sont globales et pour ainsi dire préalables à toute analyse détaillée.

L'acidité vraie ou ionique, qui dépend de la quantité d'ions H libres dans le liquide, est mesurée par la valeur du pH.

L'acidité de titration correspond à ce que certains ont appelé d'une manière ambiguë l'acidité totale : elle est mesurée par la quantité d'alcali nécessaire pour amener le vin, privé de son gaz carbonique, à la neutralité. Peu nous importe ici que les responsables de cette acidité soient organiques ou minéraux. Cette acidité est une donnée que nous mesurons telle quelle.

L'acidité organique libre ne saurait être confondue avec l'acidité de titration parce qu'elle considère la quantité d'alcali nécessaire pour neutraliser, non plus l'ensemble des acides du vin, mais les seuls acides organiques et ceux-ci ne sont pas complètement neutralisés à pH 7.

L'acidité organique totale considère l'ensemble des acides organiques du vin, aussi bien leur partie saturée que leur partie libre.

Nous pensons qu'il est maintenant facile, surtout avec la méthode que nous proposons, de distinguer ces quatre notions et de réaliser ces quatre dosages d'une manière précise et sans ambiguité.

II. — OBSERVATIONS SUR LE DOSAGE DE L'ACIDITE ORGANIQUE

Étant donné que notre méthode voudrait rendre plus facile et plus sûr le dosage des acides organiques et surtout l'appréciation de leur quantité globale, il nous faut réfléchir un instant sur le principe et les difficultés des méthodes officielles actuelles.

Difficultés inhérentes au dosage de l'acidité organique.

Si le dosage de la partie libre des acides organiques est assez facile, celui de leur partie salifiée est plus délicat. On a recours à l'incinération. Tandis que les acides forts, sous forme de sels, sont peu touchés par cette opération, les acides organiques sont détruits et disparaissent. Ceux de ces acides qui étaient libres disparaissent sans laisser de traces, tandis que ceux qui étaient salifiés abandonnent, sous forme de bases libres, les ions qui les neutralisent : les cendres deviennent nettement alcalines.

Il est dès lors possible de doser cette alcalinité en ramenant par un acide fort la solution des cendres au pH où se trouvait le vin.

Le principe de ce dosage est inattaquable, mais son application soulève maintes difficultés. L'incinération détruit les corps organiques qui se présentent ordinairement sous forme d'anions, mais aussi sous forme de cations et nous songeons à l'acétaldéhyde et aux esters.

Les ions minéraux ne sont pas eux non plus à l'abri des pertes. Rappelons tout d'abord que l'ammoniaque se volatilise totalement : il faudra donc doser ce corps de quelque manière pour ajouter son alcalinité à celle des cendres.

L'incinération, pour être correcte, doit être accomplie suivant des conditions assez précises, dans un four à moufle parfaitement réglable et qui n'admette aucune saute de température car il est difficile d'éviter les pertes de potassium, de sodium, de chlorures, etc, et un écart de température, même rapide augmente considérablement ces pertes ; or, le potassium représente la moitié des cations du vin ou même davantage. Comment évaluer toutes ces pertes? On peut heureusement supposer qu'elles sont légères si la calcination s'est effectuée à basse température.

Le phosphore court lui aussi de grands risques de disparaître en tant qu'acide phosphorique, mais aussi d'être réduit et de disparaître totalement du milieu. Beaucoup plus gênant encore est l'ion sulfureux si souvent présent par suite du sulfitage des vins. Il disparaît au cours de l'incinération, mais par deux voies différentes, soit par volatilisation sous forme de SO^2, soit, si l'oxygène est abondant, par oxydation et transformation en sulfate : dans le premier cas, l'attribution de ses cations aux acides organiques augmentera indûment le dosage, tandis qu'il se fera par défaut dans le second cas. Il paraît difficile, au cours de la minéralisation, de graduer d'une façon si précise l'oxydation que l'on puisse être certain de la proportion du sulfite oxydé ou dégagé. Ribéreau-Gayon et Peynaud (8) proposent d'admettre 75 p. 100 d'évaporation et 25 p. 100 de transformation en sulfate. « En définitive, concluent-ils (p. 242) on devra donc corriger d'une fonction de SO^2 libre et d'une demi-fonction environ de SO^2 combiné ».

Nous n'insterons pas davantage sur les aléas de l'incinération et de toutes les autres opérations requises pour ce dosage. Nous en avons assez dit pour qu'on ne s'étonne plus de voir Jaulmes (5) constater (p. 107) qu'en utilisant successivement sur le même vin blanc les trois méthodes les plus courantes de dosage de l'alcalinité des cendres, il a obtenu des valeurs aussi différentes que 14,3, 10,8 et 21 milliéquivalents par litre : il attribue aux phosphates une grande partie de ces variations.

Malgré les remarquables travaux de Brémond (1), de Jaulmes (5), de Ribereau-Gayon et Peynaud (6 et 8) toutes les objections ne sont

pas écartées. Une grande maîtrise technique et beaucoup de précautions sont nécessaires pour retrouver environ le même chiffre avec deux dosages faits en des jours différents.

L'alcalinité des cendres serait-elle donc le seul moyen qui nous permette d'évaluer la quantité d'acides organiques qui se trouvent salifiés dans le vin? Nous voudrions montrer qu'il n'en est rien et présenter une méthode beaucoup plus simple et plus précise qui aborde le problème sous un tout autre aspect. Nous allons indiquer d'abord son pricnipe et son application par PUCHER (7), nous discuterons ensuite des principales conditions qui doivent être réalisées et nous terminerons en présentant une méthode générale permettant de doser facilement les quatre types d'acidité dont nous parlions tout à l'heure.

Principe et application d'une nouvelle méthode.

Les acides organiques sont des acides faibles qui possèdent un effet tampon par l'intermédiaire duquel ils peuvent être dosés. Entre le pH3 et le pH 8 la partie essentielle de leur acidité est, soit libérée par un acide fort, soit neutralisée par une base forte. Les acides forts, par contre sont totalement salifiés au-dessous du pH3.

PUCHER et ses collaborateurs ont extrait par l'éther les acides organiques d'un milieu donné ; l'éther est évaporé et les acides mis en solution aqueuse. Ils ajoutent alors un excès d'acide nitrique et chauffent pendant une minute à douce ébullition pour chasser le gaz carbonique. Ils amènent par de la soude le milieu jusqu'au pH 8 exactement et le dosage est alors effectué avec de l'acide nitrique N/20 jusqu'au pH 2,6. Des corrections à faire sont indiquées pour les acides phosphorique et sulfurique, et pour les acides organiques.

La nécessité de corrections dans cette méthode montre que la distinction entre les acides forts, que sont les acides minéraux, et les acides faibles que sont les acides organiques, n'est pas tout à fait exacte et que tous ces acides étalent leur pK sur une échelle trop variée pour nos classifications simplistes. Malgré ces corrections, cette méthode est si simple qu'elle méritait bien d'être étudiée pour pouvoir s'appliquer au dosage des acides organiques du vin ou même à tous les dosages d'acides organiques.

Les principales modifications que nous avons fait subir à cette méthode sont l'abandon de l'éther dans lequel trop d'acides organiques sont peu solubles, l'abandon du pH 2,6 pour le pH 3, l'introduction d'une correction de volume qui permet de recommencer sur le même milieu le dosage dans le sens acide quand on vient de le faire dans le sens alcalin ou vice versa, une nouvelle étude enfin des corrections requises pour les divers acides.

III. — LES FACTEURS CORRECTIFS

Volume et pH choisis.

Aux environs de la neutralité, une trace d'acide ou de soude fait varier le pH dans d'étonnantes proportions : une goutte d'acide N/10 amène 50 ml d'eau du pH 7 au pH 4. Nous pouvons en conclure qu'entre les deux pH symétriques 4 et 10 aucune correction de volume n'est nécessaire et qu'il est rare d'avoir à tenir compte de la quantité de liquide dans laquelle se fait l'ajustement du pH. Il n'en est plus de même au-delà.

Pour que 10 ml d'eau arrivent au pH 3, il faut qu'ils contiennent 1 dixième de ml d'acide N/10 ; il en faut 3 dixièmes au pH 2,6, 5 dixièmes au pH 2,4 et 1 ml au pH 2. Un dosage au pH 3 sera donc 3 fois plus sensible et pourra être trois fois plus précis qu'au pH 2,6.

Pucher demande qu'on termine le dosage à 25 ml de volume total environ et qu'on fasse ce même dosage à blanc pour déterminer la quantité requise pour acidifier ce volume de liquide. Nous pensons qu'au pH 2,6 le volume est plus important que ne le soupçonnait Pucher, puisqu'une différence de 1 ml en plus ou en moins entraîne une différence d'un dixième de ml de l'acide qu'il emploie. Sa mesure du témoin nous paraît d'ailleurs assez imprécise puisqu'elle se situe, nous dit-il, entre 1 et 1,5 ml d'acide N/20. Le nombre théorique est de 1,5 ml et le nombre pratiquement trouvé se situe toujours au voisinage immédiat de 1,5, à moins d'impuretés ou d'erreurs, et c'est pourquoi, il devient inutile de faire des dosages témoins ; il devient même inutile de chercher à terminer le dosage avec un volume total de 25 ml, mais il est nécessaire de connaître la quantité finale à laquelle s'arrête le dosage. Étant donné qu'au pH 2,6 chaque ml demande 0,06 ml d'acide N/20 25 en demanderont 1,5, 26 en demanderont 1,56 et 40 en demanderont 3 ml. Avec le pH3 et l'acide N/10 que nous adoptons, la correction sera de 0,01 par ml, 0,1 pour 10 ml et 0,25 pour 25 ml.

Il sera donc nécessaire, à la fin de chaque dosage, de mesurer le volume total de liquide ou, plus commodément, de le peser à un demi-gramme près.

Pour le pH, nous abandonnons 2,6 pour 3. Le pH 2,6 s'imposerait si tous les acides organiques étaient libres à cette limite, mais ils ne le sont pas. Puisque des corrections sont nécessaires pour chacun, il suffira de modifier ces corrections pour profiter de la sensibilité beaucoup plus grande au pH3, pour profiter aussi du fait que l'acide sulfurique n'influe pratiquement plus, comme nous allons le voir.

Nous avons conservé le pH 8, bien que des tannins et des phénols commencent déjà à intervenir dans la neutralisation, mais cette influence

est très faible et l'on peut admettre que la quantité qui en est dosée entraîne une erreur inférieure à un dixième de ml d'acide N/10, que nous pouvons estimer compensée par la petite partie des acides organiques qui ne sont pas encore tout à fait neutralisés.

Acides minéraux.

Les principaux acides minéraux que nous trouvons dans le vin sont les acides carbonique, chlorhydrique, sulfurique, sulfureux et phosphorique.

L'acide carbonique est éliminé avant le dosage. Cette élimination s'impose dans le vin qui fermente ou vient de fermenter et, dans les vins mousseux. Cet acide n'est maintenu dans le vin qu'artificiellement pourrait-on dire, étant donné qu'il y est toujours libre, sa fonction la plus forte étant très faiblement acide avec un pK de 6,52 ; il se dégage assez rapidement du vin, dès qu'il n'est plus sous pression.

L'acide chlorhydrique est un acide fort qui, dans ce milieu complexe, est totalement salifié bien au-dessous du pH 3 et nous n'avons pas à en tenir compte.

L'acide sulfurique, avec sa deuxième fonction acide de pK 1,92 est pratiquement salifié dans sa totalité. En arrivant au pH 2,6 PUCHER en neutralisait 3,6 p. 100 ; au pH3 on en neutralise 4 fois moins soit un peu moins de 1 p. 100. La correction que cette neutralisation entraînerait pour le dosage est tout à fait négligeable étant donnée la petite quantité d'acide sulfurique présente dans le vin ; il faudrait qu'il s'en trouve deux fois plus que le maximum légalement admis pour qu'au pH 3 cette correction atteigne un centième de ml de soude N/10 : nous n'en tiendrons pas compte.

L'acide sulfureux est plus gênant, car si la première de ses fonctions acides a un pK de 1,8 la seconde a un pK de 7 : la première est toujours saturée tandis que la deuxième reste libre. L'acétaldéhyde, dont la réaction est nettement acide quand il est libre, se comporte comme un cation en face de l'acide sulfureux à la première fonction duquel il se combine. Surtout dans les vins blancs, il est rarement libre ; sa présence est vite gênante et l'une des plus efficaces fonctions de l'acide sulfureux est de le neutraliser. Tandis que cette combinaison totalement volatile pose à la méthode de dosage par incinération d'insolubles problèmes, nous n'avons pas ici à nous en occuper puisqu'elle reste en dehors des limites.

Entre les pH 8 et 3 la deuxième fonction de l'acide sulfureux est presque toute entière dosée et la première à peine touchée. Dans ces conditions 50 p. 100 de l'acide sulfureux sont pratiquement dosés et un mg de SO^2 fixera 0,15 ml de soude N/10. La correction devra donc être faite en conséquence et si, par exemple, le vin renferme 0,2 g de SO^2 par litre il s'en trouvera 2 mg dans les 10 ml du dosage et la correction

sera de 0,30 ml d'acide ou de soude N/10 : l'erreur par litre serait de 3,0 milliéquivalents.

Notons que le dosage doit être fait assez rapidement, car aux environs du pH 3 nous entrons dans la zone de la première fonction acide, dans la zone où, ses deux fonctions acides devenues libres, l'acide sulfureux commence à se dégager sous forme de SO^2.

L'acide phosphorique est important pour ce dosage par suite de ses trois fonctions acides dont les constantes de dissociation se situent aux pH 2,12, 7,2 et 11,75. Cette dernière fonction est toujours en dehors des limites du dosage, tandis que la seconde s'y trouve pratiquement toute entière et la première pour une faible partie. Pucher au pH 2,6 dosait 55 p. 100 de l'acidité totale et chaque mg de phosphore phosphorique correspondait en pratique à 1,07 ml d'acide nitrique N/ 20. En s'arrêtant au pH 3 le dosage aura le double avantage de ne plus intéresser que 41 p. 100 de l'acidité phosphorique totale soit une fonction toute entière et la cinquième partie d'une autre et d'être plus précis, parce que le milieu sera moins tamponné par la première fonction acide. La correction est moins importante et 1 mg de phosphore ne correspond plus qu'à 0,4 ml d'acide N/10. Si le phosphore est calculé en P^2O^5, la correction au lieu de 0,4 ml sera de 0,175 ml par mg, ou bien de 0,125 ml par mg de PO^4H^3. Dans les bilans acidimétriques du vin où le phosphore pratiquement considéré comme monovalent est calculé en méq. il faudra majorer tous les chiffres de 20 p. 100 pour atteindre sa valeur réelle à pH 3. Cette correction doit toujours être faite, car elle représente pour 10 ml de vin une quantité de 0,25 à 0,8 ml (ou même de 0,1 à 1 ml) d'acide ou de soude N/10, ce qui entraînerait une erreur de 2,5 à 8 (ou bien 1 à 10) milliéquivalents par litre.

Le problème est plus compliqué dans le dosage des acides libres car on mesure l'acidité à partir du pH du vin. S'il est au pH 3 nous mesurons 41 p. 100 de l'acidité phosphorique, 45 p. 100 au pH 2,8, 39 p. 100 au pH 3,2, 38 p. 100 au pH 3,4, etc. et il faudrait que le vin atteigne le pH 4 pour que la valeur d'une seule acidité intervienne. Pour être exacte, la correction ne sera donc pas la même pour l'acidité libre et l'acidité totale : 1 mg de phosphore correspond environ :

pour le pH 2,8 à 0,46 ml de liqueur titrée,
pour le pH 3 à 0,4 ml de liqueur titrée,
pour le pH 3,2 à 0,38 ml de liqueur titrée,
pour le pH 3,4 à 0,37 ml de liqueur titrée,
pour le pH 3,6 à 0,36 ml de liqueur titrée,

Le dosage du phosphore peut se faire colorimétriquement par la méthode de Misson. Après une minéralisation suivant la méthode indiquée par Ribéreau-Gayon et Peynaud (8) (p. 250) (évaporation dans une capsule et incinération avec quelques gouttes d'acide nitrique), les cendres

de 1 ml de vin sont reprises par une goutte d'acide perchlorique ou d'acide nitrique et un volume de 3 à 5 ml d'eau. On ajoute le même volume de réactif et, au bout de 10 minutes on lit au colorimètre avec le filtre bleu (environ 460 μ). Cette couleur est très stable et la lecture peut être retardée aussi longtemps qu'on voudra.

Le réactif se prépare en deux temps : on dissout dans de l'eau 100 g de molybdate d'ammonium, on ajoute 10 ml d'ammoniaque et on complète au litre ; on dissout à chaud dans 400 ml d'eau 2,345 g de vanadate d'ammonium, on refroidit et on verse lentement en agitant 20 ml d'acide nitrique (densité 1,33) au demi et l'on complète au litre. On prend alors 100 ml de chacune de ces deux solutions, on ajoute 82 ml d'acide nitrique et l'on complète à 500 ml. Ce mélange est celui qu'on utilise pour le dosage ; il se conserve indéfiniment, ainsi d'ailleurs que les deux liqueurs qui ont servi à le composer (3).

Acides organiques.

Bien que les acides organiques soient des acides faibles, certains échappent plus ou moins par quelque fonction aux dosages effectués entre le pH 8 et le pH 3. Même au pH 2,6 ce dosage n'est pas complet et PUCHER prend soin de nous indiquer pour les principaux acides organiques la partie qu'il en dose. Il est évident qu'au pH 3 ces chiffres ne sont plus valables et doivent être, non pas calculés mais mesurés à nouveau : c'est ce que nous avons fait et voici pour les principaux acides organiques du vin les proportions dosées :

Acide tartrique, 75 p. 100.
Acide lactique, 85 p. 100.
Acide citrique, 86 p. 100.
Acide malique, 87 p. 100.
Acide succinique, 98 p. 100.
Acide acétique, 98 p. 100.

Pour calculer avec précision la quantité totale des acides organiques présents, il faudrait connaître leurs proportions puisqu'on dose 98 p. 100 par exemple de l'acide succinique et 75 p. 100 seulement de l'acide tartrique. Une simple considération de cet ensemble nous permet tout de même de prévoir que la proportion moyenne ne saurait varier beaucoup dans les vins. Nous constatons en effet la présence d'un groupe central autour de 86 formé par les acides lactique, citrique et malique et deux autres groupes situés à égale distance de celui-ci, l'acide tartrique à 75 et les acides succinique et acétique à 98. Tout est en place pour un équilibre assez stable autour de 86.

Pour nous rassurer sur ce point, nous avons pris l'échantillonnage de vins donné par GENEVOIS et RIBÉREAU-GAYON (4) (p. 9 et 10) et nous

avons calculé cette moyenne, ce qui est facile puisque les bilans acidimétriques de 31 vins de toute provenance y sont donnés en détail. La moyenne générale pour tous ces vins se situe à 85,8 ; pour les 11 vins de Bordeaux elle est de 86,3, 85,8 pour les 8 vins de Bourgogne et 85,3 pour les 12 vins étrangers.

La correction de 86 semble donc s'imposer : c'est elle que l'on doit toujours employer à titre provisoire lorsqu'on ignore le bilan acidimétrique du vin et l'on est sûr de ne pas faire d'erreur importante. Si chacun des acides est, dans la suite, dosé le coefficient provisoire sera remplacé par le coefficient exact. Ce coefficient pourra s'écarter légèrement de 86, en moins si l'acide tartrique est très abondant, en plus s'il l'est très peu.

Il est évident que pour les moûts non fermentés, où les acides succinique et acétique sont presque inexistants, ce coefficient sera beaucoup plus bas et peut descendre à 82 ou même 81.

IV. — METHODE DE DOSAGE PROPOSÉE

Mode opératoire.

Après avoir expulsé le gaz carbonique par le vide à froid, on met 10 ml de vin dans le récipient du pH-mètre. On note le pH. Avec de la soude N/10 on fait arriver le liquide au pH 7, puis au pH 8. Avec de l'acide nitrique N/10 on passe alors du pH 8 au pH 3 et on mesure (à la balance) le volume total du liquide.

Si nous connaissons la quantité d'acide phosphorique et d'acide sulfureux présents dans le vin, nous avons tous les éléments du dosage.

1. — L'acidité ionique ou vraie est donnée par le pH mesuré au départ.

2. — L'acidité de titration est donnée par la quantité de soude nécessaire pour passer du pH du vin au pH 7 (1). Étant donné que le dosage se fait sur 10 ml et avec une base N/10 le nombre de milliéquivalents par litre est donné directement par le nombre de dixièmes de ml de soude employés.

3. — L'acidité organique libre est mesurée par la quantité de soude nécessaire pour passer du pH du vin à pH 8. De ce nombre il faut défalquer ce qui revient à l'acide phosphorique d'après le pH (cf. ci-dessus) et à l'acide sulfureux (0,15 ml ou 1,5 méq. par mg de SO^2).

4. — L'acidité organique totale est mesurée par la quantité d'acide nécessaire pour passer du pH 8 au pH 3. Après les corrections pour les acides phosphorique et sulfureux et pour le volume, on tient compte de ce

(1) Pour cette mesure il ne convient pas de faire les corrections qui s'imposent pour le dosage de l'acidité organique : il s'agit en effet d'évaluer purement et simplement l'acidité de titration de ce liquide dont on vient de mesurer le pH, et dans ce pH l'acide phosphorique intervient aussi bien que l'acide sulfureux.

que 86 p. 100 seulement des acides sont dosés et le nombre de ml d'acide obtenu après les corrections est divisé par 86 et multiplié par 100.

Soit un vin de Gaillac dont nous prenons 10 ml. Son pH est de 3,20. Pour arriver au pH 7 il faut 8,4 ml de soude N/10 et 0,3 en plus pour arriver au pH 8. Du pH 8 au pH 3 il faut 9,05 ml d'acide nitrique N/10 et le volume final de notre milieu est 28 ml.

Ce vin contient par litre 75 mg de phosphore et 0,2 g de SO_2. Les corrections à faire seront donc :

pour le phosphore de 0,3 ml pour l'acidité totale, soit $0,75 \times 0,4$, et de 0,285 ml pour l'acidité libre, soit $0,75 \times 0,38$ (cœfficient pour le pH 3,2).

pour l'acide sulfureux de 0,3 ml, soit $2 \times 0,15$,

et pour le volume de 0,28, soit $28 \times 0,01$.

Nous obtenons ainsi :

1. — *acidité vraie* : pH 3,2 ;

2. — *acidité de titration* : 8,4 ml de soude = 84 méq. par litre ;

3. — *acidité organique libre* : 8,7 — 0,585 = 8,115 ml, soit 81 méq. par litre (8,7 représente la quantité de soude pour aller du pH du vin au pH 8, soit 8,4 + 0,3 ; 0,585 représente les deux corrections de l'acide phosphorique et de l'acide sulfureux).

4. — *acidité organique totale* : $9,05 - 0,88 = 8,17 \times \frac{100}{86} = 9,5$ ml, soit 95 méq. par litre (0,88 représente la triple correction du phosphore, 0,3, de l'acide sulfureux, 0,3, et du volume, 0,28).

Remarques.

Il est évident que si le pH du vin est exactement égal à 3, la quantité de soude permettant de calculer les acidités organiques libre et totale est la même, mais ne subira pas les mêmes corrections : elles sont les mêmes pour les acides phosphorique et sulfureux mais l'acidité totale seule doit subir la correction de volume. L'acidité libre représente en effet un total, quel que soit le pH du vin, tandis que le maintien au pH 3 requiert une partie plus ou moins importante d'acide suivant le volume du milieu et cette quantité doit toujours être défalquée pour que le dosage soit correct et fidèle.

Si le vin est plus acide que pH 3, 2,8 par exemple, on notera la quantité de soude nécessaire pour arriver au pH 3 et tout sera dosé en un seul passage puisqu'une seule neutralisation permet d'acquérir toutes les données.

Après la fin du dosage, il est tout à fait possible de le recommencer en sens inverse et de passer du pH 3 au pH 8 et de nouveau encore du pH 8 au pH 3 : La correction de volume sera de plus en plus importante et le dosage de moins en moins précis. Il ne faut pas oublier que si l'on va du

pH 3 au pH 8 la correction de volume à faire est celle du départ et non celle de l'arrivée.

Notons en terminant que le dosage classique après incinération, etc, donne des valeurs à peu près identiques, à condition bien entendu que l'incinération soit effectuée sans pertes et toutes les corrections faites. Il sera bon de répéter plusieurs fois ces dosages comparatifs sur le même vin et cela permettra de vérifier combien la méthode que nous présentons est plus fidèle et surtout plus rapide.

Pour les dosages d'acides organiques dans d'autres milieux que le vin, la méthode reste la même, mais il sera bon, sur des liquides moins acides que le vin de prendre des liqueurs de titrage, acide nitrique et soude, moins concentrées, N/20 par exemple. De plus, la correction pour les acides organiques ne sera sans doute pas 86 et devra être calculée d'après les acides organiques présents.

V. — CONCLUSIONS

Il est facile de doser au pH-mètre les acidités du vin vraie et potentielle et de distinguer dans cette acidité la part qui revient aux acides organiques, grâce à leur effet tampon.

En quelques minutes et avec assez peu de corrections s'effectue un dosage que de multiples manipulations rendaient jusqu'ici long et difficilement fidèle.

Avec quelques légères adaptations, cette méthode peut-être employée pour tout dosage d'acides organiques.

Reçu pour publication le 29 juillet 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Brémond (E.). — Étude analytique et physico-chimique de l'acidité des vins. Alger, 1937.
(2) Semichon (L.) et Flanzy (M.). — Étude des acides organiques des vins et des jus de fruits naturels ou fermentés. — I : Définition de l'acidité et détermination des acides organiques. *Ann. Agr. Nouvelle Série*, **2**, 199-214, 1932. — II : Les acides gras volatils. *Ann. Agr. Nouvelle Série*, **2**, 502-528, 1932.
(3) Fleury (P.) et Leclerc (M.). — La méthode nitro-vanado-molybdique de Misson pour le dosage colorimétrique du phosphore. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25**, 201, 1943.
(4) Genevois (L.) et Ribereau-Gayon (J.). — Le vin. Hermann, 1947.
(5) Jaulmes (P.). — Analyse des vins, 2e édition, Montpellier, Poulain, 1951.
(6) Peynaud (E.). — Contribution à l'étude biochimique de la maturation des raisins et de la composition des vins. Thèse, Bordeaux, 1946.
(7) Pucher (G. W.), Wakeman (A. J.) et Vickery (H. B.). — *Industr. Eng. Chem. Anal. Edit.*, **6**, 40, 1934 ; **13**, 244, 1941.
(8) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins Béranger, 1951.

CHRONIQUE DES LIVRES

TRAITÉ D'ŒNOLOGIE BOURGUIGNONNE (1)

PAR

L. FERRE

Publié neuf ans après la mort de l'auteur, le « Traité d'Œnologie Bourguignonne » de L. FERRE est composé d'extraits de bulletins de l'Institut National des Appellations d'Origine des Vins et Eaux-de-Vie.

L'ouvrage est divisé en deux parties.

La première est consacrée au raisin et à la vinification.

Dans le chapitre premier, l'auteur étudie la formation du raisin et son développement ; sa morphologie, sa constitution chimique, les caractères du raisin à maturité, la relation entre le degré de maturation et la qualité, le passerillage naturel ; l'influence de divers facteurs sur la qualité du raisin (sol, altitude, exposition, cépages, porte-greffes, conditions atmosphériques et culturales : taille, rendement, rognage, effeuillage ; les maladies cryptogamiques : mildiou, oïdium, pourriture grise ; les insectes ampélophages : cochylis, eudémis ; les maladies physiologiques : rougeot, brunissure, millerandage ; les accidents météorologiques : gelée, grêle, ercissement, grillage et échaudage).

Le deuxième chapitre traite de la vendange et du matériel de fermentation. On y définit la date et le ban des vendanges, la cueillette et le ramassage des raisins, le triage et épluchage, les cuveries, les cuves en bois (avec étude de leur étanchéité et aseptie), les cuves en ciment et leur affranchissement.

Le troisième chapitre indique les principales améliorations susceptibles d'être apportées à la vendange, en insistant surtout sur le sucrage, seul pratiqué de façon courante en Bourgogne. L'auteur rappelle l'historique et la réglementation de la chaptalisation, et passe en revue les critiques faites le plus fréquemment à ce procédé, le choix des sucres, la quantité à utiliser, son mode d'emploi. Il rappelle aussi la pratique du sucrage par addition de moût concentré, qui ne peut rivaliser avec la précédente en particulier à cause de son prix de revient.

Il étudie ensuite le passerillage artificiel des raisins, l'acidification et la désacidification de la vendange. Quelques lignes sur le tanisage terminent ce chapitre.

La vinification des vins rouges fait l'objet du chapitre IV. L'auteur prend le raisin au moment où il arrive à la cuverie. Il examine d'abord son traitement

(1) Institut National des Appellations d'Origine des Vins et Eaux-de-Vie. Paris.

mécanique, (foulage, égrappage, ses avantages et inconvénients), le sulfitage de la vendange (action physiologique, physique et chimique), passe en revue les différents modes de sulfitage (métabisulfite de potasse, solutions sulfureuses simples ou nutritives), les conditions qui influent sur la fermentation (la température — température optima, température critique), — le refroidissement de la vendange ou des cuves, leur réchauffement, la surveillance de la fermentation et de la température), les divers modes de cuvaison (à chapeau flottant ou à chapeau immergé), la durée de la cuvaison, le décuvage, le pressurage, la composition du vin de presse, la remise des vins en cuve après décuvage, le chauffage des vins, le rendement en alcool, la couleur des vins rouges, facteur particulièrement important pour les vins de Bourgogne ; la vinification par chauffage des raisins entiers, l'application à la vinification des vins rouges, le refroidissement des raisins chauffés, l'extraction du moût et la mise en fermentation, les avantages et inconvénients de ce mode de vinification.

Le chapitre V donne brièvement des notions de vinification des vins gris et rosés.

La vinification des vins blancs, principalement issus en Bourgogne de 3 cépages : Chardonnay, Aligoté, Melon, est traitée au chapitre VI. L'auteur passe en revue les conditions de vendange, le foulage, le pressurage, le sulfitage, le débourbage, le sucrage, la fermentation : nutrition des levures, influence du volume des fûts et de leur remplissage, influence de l'oxygène, de la température, et indique pour terminer une méthode rationnelle de vinification.

La deuxième partie est consacrée à la conservation et à l'élevage des vins.

Le chapitre VII débute par le rappel des réactions internes des vins et du mécanisme de certaines transformations d'une importance capitale pour l'évolution des vins en général et des vins fins en particulier. Il définit la notion d'acidité ionique et passe en revue les phénomènes colloidaux et d'oxydo-réduction dont les vins sont le siège.

Les vins nouveaux sont étudiés au chapitre VIII. L'auteur rappelle les soins et traitements dans l'ordre où ils doivent s'effectuer à partir du moment où la fermentation principale est achevée. Ces traitements devant tenir compte de l'état particulier de chaque vin, il est nécessaire de procéder à leur examen préalable pour en connaître les caractéristiques essentielles : degré, acidités fixe et volatile, sucre restant, tenue à l'air. L'auteur étudie ensuite les fermentations secondaires, en particulier la fermentation malo-lactique, puis indique les soins à donner aux vins nouveaux, compte tenu de leur évolution propre : ouillage, fermeture des fûts, soutirage.

Les soins et traitements élémentaires à donner aux vins vieux conservés en fûts sont passés en revue au chapitre IX : ouillages, soutirages, collage (son but, son mécanisme, les principaux produits utilisés, la pratique du collage des vins blancs et des vins rouges) l'action du collage sur la couleur, les troubles produits par les tanins dans le cas des vins blancs, le collage des vins blancs jaunes.

Le chapitre X étudie les traitements complémentaires à apporter aux vins vieux en fûts ; filtration (son mécanisme, son action stérilisante, action comparée de la filtration et du collage, les principaux filtres, examen des vins avant filtration et traitements spéciaux à leur appliquer, filtration à la mise en bouteilles), pasteurisation (son principe, pasteurisation en bouteille ou en fût, ses effets, stérilisation par les rayons U. V., pasteurisation électronique, avec discussion des résultats expérimentaux obtenus par l'auteur dans ce

dernier cas), refroidissement et congélation, défécation sans congélation, concentration par congélation, casse hydrolasique, action du froid sur les vins, la chaleur et le froid en vinification : application du froid et de la chaleur à la fermentation (action sur les levures, sur les microorganismes, action de la température sur la macération), frigorification des vins, congélation, préparation des vins mousseux, stabilisation des vins par action combinée de la chaleur et du froid.

Le chapitre XI traite du vieillissement naturel et artificiel des vins, étudie les pertes d'alcool pendant la vinification et la conservation, les dépôts en bouteilles.

Le chapitre XII est consacré aux maladies des vins : maladies d'origine microbienne, dues à des ferments aérobies (mycoderma vini, mycoderma acéti), avec leurs conséquences pratiques pour la conservation des vins en vidange, maladies dues à des ferments anaérobies (tourne, amertume, graisse) et définit les caractères qui rendent les vins impropres à la consommation. Il s'attache ensuite aux maladies d'origine diastasique (casse oxydasique, casse jaune des vins blancs, traitements des vins jaunes, casse hydrolasique), et d'origine chimique (casse bleue, casse blanche, casse ferrique accidentelle, casse cuivreuse).

Les goûts accidentels et leurs traitements sont étudiés au chapitre XIII : goût d'hydrogène sulfuré, mercaptans, de bois sec, de moisi, de pourri, de croupi, de cuivre, de pétrole, de goudron, de créosote, de crésyl, d'évent. Un tableau dichotomique des principales altérations naturelles et accidentelles des vins termine cet exposé.

Quelques problèmes divers sont groupés dans le chapitre XIV : préparation du matériel vinaire, clarification des vins blancs tachés, soins à donner aux vins sucrés, étude de la couleur des vins rouges, tenue du carnet de vinification et de cave, vinification et conservation des vins à appellation d'origine en Bourgogne.

Fruit d'une longue expérience bourguignonne, l'ouvrage de L. Ferre sera lu avec profit par tous ceux qu'intéressent l'élaboration et la conservation des vins, quelle que soit leur implantation géographique. Bien que dépassé sur quelques points par la rapidité du progrès, il garde toute sa valeur d'enseignement et demeure le témoignage d'une époque où furent jetées les bases de l'œnologie moderne. A ce sujet les travaux de L. Ferre sur la fermentation malo-lactique sont significatifs de son esprit d'observation et d'analyse.

M. Flanzy.

LE COGNAC — SA DISTILLATION (1)

PAR

R. LAFON, J. LAFON, P. COUILLAUD

R. et J. LAFON, P. COUILLAUD, publient la troisième édition de leurs « Notes sur la distillation dans les Charentes ». Le texte primitif a été augmenté de compléments historiques, économiques et juridiques, qui les ont amenés à modifier le titre original, devenu :

« Le Cognac ; sa distillation »

Les auteurs font d'abord l'historique de la distillation au cours des siècles, rappellent les origines du Cognac et l'évolution du vignoble charentais, et indiquent quels sont les vins réservés à la production du Cognac.

La distillation du vin apparaît dans la région de Cognac au début du XVIIe siècle, puis se généralise en Saintonge et Angoumois par suite de la mévente du vin frappé de droits excessifs. Au début, la production de l'alcool était abondante et de qualité médiocre ; on s'attacha par la suite à obtenir des alcools « bon goût ». Après la crise phylloxérique, le vignoble charentais fut reconstitué grâce, en particulier, à l'aide de la Station Viticole de Cognac.

Les vins réservés à la production du Cognac doivent être francs de goût, avoir une acidité fixe importante, essentielle pour assurer une sélection partielle des levures et bactéries au cours de la fermentation et une bonne conservation jusqu'à la distillation. En raison de ses inconvénients multiples, l'anhydride sulfureux ne peut être utilisé pour cet usage. D'autre part, leur degré alcoolique ne doit pas être trop élevé, sans toutefois qu'on puisse affirmer que les vins les plus faibles en degré donnent les meilleures eaux-de-vie. Les meilleurs vins de base sont les vins blancs, qui contiennent peu de substances tannoïdes. Lorsque les raisins ne subissent pas la surmaturation, les éléments du bouquet protégés par certaines substances réductrices, échappent à l'action destructrice de l'oxydation. Les eaux-de-vie obtenues sont alors très parfumées.

Dans une autre partie, les auteurs étudient les facteurs qui influent sur la qualité des eaux-de-vie, les uns, propres aux vins utilisés ou aux conditions physiques, géophysiques ou météorologiques, les autres, conséquences de la distillation.

Plusieurs facteurs jouent un rôle essentiel dans la qualité des eaux-de-vie de Cognac. Tous les cépages à arômes spéciaux ou à maturité trop précoce (qui donnent des eaux-de-vie plates) doivent être rejetés ; les meilleurs sont la « Folle Blanche » et le «St Emilion ». Le « Jurançon » donne des eaux de vie un peu moins fines.

(1) Éditeur J. B. Baillière et Fils, Paris.

Le terrain a une influence incontestable, par son origine géologique, sa texture, et les races de levures qui s'y développent.

La lumière et la chaleur ont une action importante sur la plupart des composés organiques du raisin.

Enfin, certains procédés de vinification ont une influence néfaste sur la qualité des eaux-de-vie.

Les auteurs décrivent ensuite en détail l'alambic charentais, son fonctionnement, les modalités de distillation, et définissent les caractéristiques des vins à rechercher pour la chaudière.

La qualité d'une eau-de-vie dépend pour beaucoup de l'appareil de distillation utilisé. Les auteurs donnent une description minutieuse et détaillée de chaque élément de l'alambic charentais. (chaudière, chapiteau, chauffe-vin, pipe, serpentin, cuves à brouillis, dalles de refroidissement) et du montage de l'appareil.

Dans l'alambic charentais, le vin avec sa lie est soumis à une distillation discontinue à repasses successives. On obtient le « brouillis » titrant de 24 à 32° selon le degré du vin mis en œuvre, et les « queues » qui titrent entre 5° et 0°. A la troisième chauffe, on obtient suffisamment de « brouillis » pour procéder à la « bonne chauffe ». Par distillation de ces « brouillis », on obtient :

— « les têtes » dont on élimine 1 à 2 p. 100 ;

— « le cœur », qui s'écoule jusqu'à 60° ou 58° d'alcool.

— « la seconde » qui passe ensuite jusqu'à 0°.

Entre ces deux dernières fractions, s'effectue la « coupe ».

Longue et couteuse, la distillation charentaise donne un produit supérieur aux eaux-de-vie obtenues par d'autres méthodes.

Il est utile pour le distillateur de connaître l'instant de passage de tel goût ou telle odeur, en particulier du goût de « seconde » car ce dernier conditionne la « coupe » à faire.

L'expérimentation des auteurs a porté sur des échantillons prélevés de 5 en 5 degrés durant les « brouillis » et les « bonnes chauffes ». L'analyse de ces échantillons a permis de tracer des courbes qui traduisent le passage des composants du distillat en fonction du degré de celui-ci. De l'étude de ces courbes, les auteurs ont conclu que le passage des impuretés du « non alcool », au cours de la distillation charentaise, présente la même allure quels que soient les alambics utilisés. L'intensité du chauffage entraîne des différences très sensibles. Le goût de « seconde » apparaît plus lentement et plus faiblement en chauffe lente. La plus grande partie du « non alcool » distille au début de la chauffe, et passe avec les produits de tête. Quand le vin est bon, les produits de « queue » sont presque toujours plus mauvais que les produits de tête.

Le cuivre joue un rôle important au cours de la distillation. L'eau-de-vie, à la sortie de l'alambic, en contient toujours un peu (quelques mg par litre) entraîné lors de la condensation des vapeurs alcooliques dans le chapiteau et le serpentin. Il se combine aux acides gras présents dans le vin et entraînés pendant la distillation. On élimine ainsi les savons de cuivre des acides butyrique, caproïque, caprylique, caprique et laurique. Doués d'une odeur désagréable et pénétrante, ces acides sont sécrétés en grande partie par les levures au cours de la fermentation. Le cuivre est donc un élément favorable à la qualité des eaux-de-vie.

La distillation aura lieu dans la période même qui suit la récolte. Les vins non distillés seront soutirés en mars. Toutefois, il ne faut livrer à la chaudière

que des vins complètement fermentés, et qui ne seront pas restés longtemps en vidange.

On ne doit distiller avec leurs lies que des vins provenant de vendanges rigoureusement saines. Dans le cas de vendanges à l'état de « bon pourri », il est recommandé de faire, au début de la distillation, une « bonne chauffe » avec des « brouillis » provenant du vin mélangé à sa lie, grosse lie exceptée, et une « bonne chauffe » avec des « brouillis » du vin soutiré. La comparaison des eaux-de-vie obtenues permettra de déterminer la méthode à utiliser.

En année de vendange avariée, il est spécialement recommandé de conduire le feu de telle façon que les chaudières se mettent « au courant » très lentement, ce qui permet de bien séparer les produits de tête souvent très défavorables à la finesse et à la qualité de l'eau-de-vie.

Il n'existe pas de règles générales absolues pour la distillation par brouillis. Un bon distillateur doit être à même de modifier sa façon de procéder suivant le degré et la qualité des vins utilisés. Les auteurs mentionnent toutefois les opérations qui peuvent contribuer à augmenter la qualité de l'eau-de-vie, et celles susceptibles de nuire à sa finesse. Ils donnent en outre des conseils généraux pour faire de bonnes eaux-de-vie avec des vins normaux, et énoncent les règles permettant de déterminer approximativement le degré auquel on doit faire la « coupe » pour avoir de l'eau-de-vie à 70°.

Les auteurs étudient ensuite la distillation au goût et la redistillation.

La distillation au goût, pratiquée de tous temps, consiste à sentir et goûter tous les « brouillis » ainsi que toutes les « bonnes chauffes » pour déterminer le meilleur moment pour effectuer les « coupes ».

Pour redistiller une eau-de-vie, il suffit de la réduire au degré d'un « brouillis » ordinaire (26-28°) avec de l'eau distillée ou de l'eau de pluie. Cette redistillation peut améliorer les eaux-de-vie sans que le « non alcool » soit modifié de façon très sensible.

Les eaux-de-vie nouvelles présentent parfois des défauts, qu'une bonne dégustation permet de déceler et d'identifier.

Ils envisagent également les conséquences pour le cognac d'un séjour prolongé en fûts de chêne. Le bois doit être de bonne qualité, bien sec, et le fût subir une préparation soignée.

Pendant ce séjour, le Cognac subit des modifications très apparentes : diminution de volume (par évaporation lente à travers les parois et la fermeture incomplète de la bonde), réduction du titre alcoolique (également par évaporation, l'alcool étant plus volatif que l'eau) ; dissolution des principes solubles du bois des futailles (matières colorantes et odorantes, matières minérales), dissolution d'oxygène, évolution du cuivre présent à la sortie de l'alambic (diminution d'abord, par suite de sa précipitation par le tannin, puis redissolution par augmentation de l'acidité du cognac au cours du vieillissement), oxydation lente (due à l'oxygène dissout à la surface du liquide, catalysée par la fraction aglycone des tannins), acétalisation (catalysée par la baisse du pH et du degré alcoolique), rancissement des corps gras (catalysé par la présence du cuivre et la baisse du pH).

On observe en général que le maximum de qualité est acquis par vieillissement naturel au bout de 40 ou 50 ans. Bien que le processus général de ce vieillissement soit actuellement à peu près connu, l'ensemble des modifications subies par une eau-de-vie pendant cette période est très complexe, essentiellement tributaire du temps, et échappe à toute tentative de reproduction artificielle.

Les auteurs situent enfin le cognac dans l'économie régionale, nationale, internationale, et définissent le droit à l'appellation, l'utilité et les limites de ce droit.

Le « Cognac » tient une place importante dans l'économie interne et l'exportation. Seules certaines eaux-de-vie ont droit a cette appellation. Certains crus — dont les auteurs donnent la liste — peuvent entrer dans sa fabrication. Les délimitations ont fait l'objet d'un decret du 1er mai 1909.

La protection internationale du nom de Cognac, rendue nécessaire par le caractère mondial du commerce des eaux-de-vie charentaises, s'intègre dans le problème plus général de la protection des appellations d'origine.

Un rappel de la valeur alimentaire et thérapeutique du Cognac, des notions sommaires d'alcoométrie et d'analyse des cognacs, terminent cet ouvrage, qui apporte aux professionnels, non seulement des conseils et des enseignements mais l'explication de cet art difficile qui est le leur.

M. F.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

LE PROBLÈME RHÉOLOGIQUE DES INDUSTRIES DES CÉRÉALES (1)

PAR

J. BURÉ

École française de Meunerie, Paris.

GÉNÉRALITÉS

Quand on parle de *farine*, on évoque immédiatement des impressions de blancheur, de finesse qui résument le travail du meunier. Les utilisateurs de farine distinguent toute une gamme subtile de nuances dans la blancheur et déterminent des variations considérables dans la composition en grosseur de ce produit fini. De plus ces 2 qualités ne leur sont pas suffisantes et ils exigent des aptitudes technologiques :

— facilitant leur travail,
— accroissant leur rendement de fabrication,
— améliorant la qualité des produits finis.

Les exigences varieront selon les utilisateurs. Les demandes du Biscottier pourront être diamétralement opposées à celles d'un Biscuitier.

Dans une même spécialité il y aura éventuellement de grandes divergences.

Quelle que soit la diversité de qualité des farines et semoules recherchée, le premier soin de presque tous les utilisateurs est de commencer à faire une *pâte*. Les pâtes varient non seulement par la qualité des farines et semoules mises en jeu, mais aussi :

— par leur teneur en eau (30 à 60 p. 100) ;
— par la présence de matières premières complémentaires (sucres, matières grasses, parfums, colorants, adjuvants,
— par l'intensité du pétrissage
— et par la durée du repos.

(1) Conférence faite au Cours de Perfectionnement technique de la Maison de la Chimie, le 29 avril 1958, dans le cycle Rhéologie et sous la présidence de M. Lucien Brisson Pt. de l'Association nationale de la Meunerie Française et de l'Union des Industries agricoles et de M. Marcel Chopin.

Les différences de qualités initiales des matières premières seront ainsi accentuées et pourront être adaptées aux diverses technologies.

On aboutit à une si grande *diversité de pates* (1) (boulangerie, biscotterie, biscuiterie, fabrique de pâtes alimentaires) que leur étude comparée pourrait sembler impossible. Il faut commencer par l'étude de la pâte la plus simple, celle où la farine est pétrie uniquement avec de l'eau (correspondant d'ailleurs à la définition des dictionnaires (2). La teneur en eau des pâtes peut varier dans la pratique industrielle de 30 à 60 p. 100, mais on débutera par des hydratations moyennes permettant d'obtenir les qualités les plus caractéristiques.

Comment déterminer la valeur technologique des pâtes?

ESSAIS INDIRECTS D'APPRÉCIATION DE LA VALEUR TECHNOLOGIQUE DES PATES

Tous les industriels des céréales font le grand honneur à la farine de la considérer comme responsable n° 1 de leurs ennuis éventuels de fabrication. Certainement parmi les constituants des pâtes, la farine est l'élément « noble « celui qui permet la formation de la pâte, celui qui est susceptible du maximum de variations.

Il semble rationnel de rechercher quels sont les éléments des farines responsables de la valeur technologique des pâtes. Les français les premiers, en disciples de DESCARTES, ont essayé de trouver dans les propriétés des protéines du froment (si différentes de celles des autres céréales) la clef du problème. Malgré de nombreuses recherches, il n'a pas encore été possible de trouver des différences suffisamment significatives. Les savants français persévèrent cependant et nous allons indiquer l'orientation des travaux entrepris depuis 1946 par les membres de la Commission PROTEINES du C. N. E. R. N. A. sous l'égide du Prof. TERROINE.

— Examen électrophorétique — détermination des points isoélectriques sur coupe de tissus (M. SWYNGEDAUW).

— Gonflement et dispersion du gluten dans les acides. Similitude de gonflement entre la gliadine et la gluténine (MM. GUILLEMET-GUILBOT).

(1) *Le Fabricant de pâtes alimentaires* forme la pâte la plus simple, puisqu'il n'ajoute à la farine et aux semoules de froment que de l'eau.

— *Le Boulanger français* sale légèrement la pâte, mais la principale différence provient de l'ensemencement en levure et d'une hydratation plus grande.

— La pâte du *Biscottier* contient, en outre, des matières grasses, un peu de sucre et quelquefois du lait et du malt.

— Enfin, le *Biscuitier*, parmi ses nombreuses fabrications, introduit encore des produits plus variés (matières sucrantes, matières grasses, œufs, arômes, colorants...). La plupart des pâtes contiennent, en outre, des produits chimiques provoquant un dégagement gazeux à l'intérieur des produits. Enfin, la gamme des pâtes de biscuitiers, présente non seulement des différences de compositions, mais aussi de consistance qui varie de la plus ferme à la plus molle.

(2) Dictionnaire de l'Académie française 1778 — *pâte* : farine détrempée et pétrie pour faire du pain ou quelque chose de semblable bon à manger — Larousse — *pâte* : farine délayée avec de l'eau et pétrie.

— Azote amidé des blés et farines (M. GENEVOIS).

— Spectres d'absorption dans l'ultra violet des produits plus ou moins oxydés (M. GRABAR).

— Pouvoir moussant du gluten et étude des constituants solubilisés par étalement en lame mince (M. GUASTALLA).

C'est cette dernière étude qui est actuellement la plus riche de promesses. M. GUASTALLA présume une relation entre les qualités boulangères de la farine et les possibilités de solubilisation de ses protéines. Il semble aussi qu'il faille tenir compte de l'action insolubilisante de la phytine sur les protéines et de l'action concurrente de la phytase sur la phytine.

Au cours des dernières réunions de travail il a été envisagé de poursuivre les différenciations de propriétés des glutens provenant de farines fortes et de farines faibles par :

— l'étude du spectre hertzien du gluten (M. GIRARD)

— l'emploi de l'immunologie (M. GRABAR) ;

— l'action des ultra sons sur le gluten pour essayer de libérer les acides aminés terminaux afin de préciser certaines liaisons secondaires de structure (M. PETIT) ;

— l'analyse de la composition en acides aminés et des propriétés physico-chimiques de la gliadine (M. MOSSE) ;

— l'étude des liasons soufrées, de la solubilité dans l'acide ascorbique, des combinaisons sucres gluten (PETIT), des liaisons des dérivés phophorés avec le gluten (BOURDET) etc.

A l'étranger les recherches présentes sont moins orientées vers les caractéristiques des protéines (dérivés SH - dispersion en fonction du pH) et on dénoterait plutôt une tendance actuelle à étudier le rôle des glucides et en particulier de l'amidon en ce qui concerne la valeur technologique des blés et farines. Ces composants sont certainement moins caractéristiques que le gluten mais ils représentent le pourcentage majeur (plus de 70 p. 100 de la farine). Le rôle des lipides plus ou moins oxydés a été également envisagé.

APPRÉCIATION DIRECTE EMPIRIQUE DES QUALITÉS DES PATES

A défaut de connaître les origines profondes des qualités des pâtes, tous les spécialistes ont trouvé dans l'appréciation directe des qualités des pâtes le moyen le plus efficace de tester la valeur technologique des farines.

En 1946, dans cette Maison de la Chimie, nous avions passé en revue (5) les divers moyens d'apprécier les qualités plastiques des pâtes de farine de froment. Depuis 12 ans, il y a eu davantage d'améliorations des appareils existants, de perfectionnement des modes opératoires et même des principes utilisés, que de créations de prototypes originaux.

Les nouveaux appareils (pénétromètre de HAGBERG et de MAES,

balance TAUPIN, le Néolaborographe RADA et même l'appareil de HLYNKA) qui ont vu le jour depuis 1946 se classent facilement avec les anciens appareils.

On rappelle les 4 principaux groupes d'appareils :

1e groupe : les *viscosimètres* (plastomètres, pénétromètres, viscosimètres de torsion) essayent de déterminer l'absorption d'eau optimum et peuvent « chiffrer » une *consistance* de la pâte.

2e groupe : les *pétrins enregistreurs* filment l'évolution de quelques propriétés de la pâte au cours d'un pétrissage très énergique et très prolongé.

3e groupe : les appareils provoquant le *gonflement pneumatique d'une bulle* donnent un instantané de certaines propriétés plastiques des pâtes à un moment donné.

4e groupe : les appareils provoquant l'*étirement des pates* ont été surtout conçus pour une étude théorique des pâtes.

On pourra retrouver dans ma conférence de 1946 (5) les schémas des appareils qui sont répandus dans le monde à des milliers d'exemplaires et qui chiffrent la valeur boulangère de plus de 90 p. 100 des blés et farines qui sont commercialisés.

La plupart des appareils ont été imaginés pour apprécier en premier lieu la valeur boulangère des blés et farines. Ce sont les pays de l'Europe occidentale où pousse peu de blé de force, qui ont surtout inventé les appareils susceptibles de mettre en évidence les indices de la valeur boulangère, de manière à utiliser au mieux leurs blés indigènes et de manière à les améliorer.

Aucun des appareils utilisés n'est cependant capable de chiffrer avec rigueur la valeur boulangère. En redéfinissant la valeur boulangère on entrevoit déjà la grande difficulté du problème.

La *valeur boulangère* correspond à toutes les qualités d'une farine permettant d'obtenir beaucoup de beau et bon pain. Cette définition sous-entend la connaissance de la technologie boulangère du pays et les habitudes subjectives du consommateur.

La qualité du pain dépend essentiellement de la bonne marche de la fermentation panaire qui doit assurer non seulement un dégagement de gaz carbonique suffisant pour développer le pain au maximum, mais qui doit aussi améliorer les caractères organoleptiques. C'est indispensable mais ce n'est pas suffisant. Il faut encore que le gaz carbonique produit, puisse être retenu par la pâte.

Il faut qu'à la fin de la panification les qualités plastiques de la pâte soient à leur optimum pour pouvoir former des parois d'alvéoles bien fines, bien régulières, et suffisamment imperméables tout en communiquant au pâton une certaine stabilité et une certaine élasticité.

En France, les caractéristiques de fermentescibilité des blés ne sont jamais déficientes (1) et la qualité des levures présentées par les fabricants est très régulière, si bien que la qualité du pain dépend surtout des qualités plastiques

des pâtes. Par extension la *force boulangère* des farines est devenue synonyme de *valeur boulangère*.

Il faut insister sur le fait que cette appréciation n'est pas faite en valeur absolue. Il n'y a pas une valeur boulangère, mais des « valeurs boulangères » adaptées au mode de fabrication national ou régional et même aux habitudes de certains boulangers. Il n'y a aucun doute que la valeur boulangère souhaitable, n'est pas la même pour le fabricant de biscottes que pour le boulanger artisanal et même industriel, n'est pas la même pour l'ouvrier boulanger qui travaille sur direct ou pour celui qui utilise les levains.

C'est le point de vue du *boulanger* qui a été le plus étudié mais les appareils peuvent être modifiés et adaptés à l'étude des autres *industries utilisatrices* des farines.

Depuis plus de 20 ans, les divers utilisateurs des farines ont essayé de traduire et de chiffrer plus ou moins scientifiquement les indices comparatifs de force ou de la faiblesse des farines les mieux appropriées à leur mode de fabrication et à leur matériel.

Ainsi peut-on actuellement indiquer en France des *Alveogrammes chopin typiques* de farines permettant la fabrication facile de pains ordinaires — de pains de gruaux — et de certains biscuits, etc.

(Ex : W minimum 100 avec une courbe 2 fois plus longue que haute pour les farines panifiables ordinaires).

PROBLÈME RHÉOLOGIQUE

Les impressions empiriques accumulées depuis des générations au cours du travail direct des pâtes se transforment peu à peu en *données rhéologiques*. Pendant très longtemps la plupart de nous avons fait de la rhéologie sans le savoir, car cette science n'était étudiée dans chaque pays que par de très rares spécialistes. Il y a maintenant des Congrès internationaux de rhéologie et depuis 1954 est constitué le groupe français de rhéologie, qui prend place avec ses aînés américains et anglais dans cette famille internationale des Sociétés de rhéologie.

Nous sommes reconnaissants aux fondateurs de ce groupe d'études de rhéologie d'avoir organisé des cyles de conférences à la Maison de la Chimie montrant les problèmes communs à des spécialités si diverses (métaux — verre — béton — terre — caoutchouc — plastiques — pétrole — textiles — peintures vernis et farines...) permettant de comparer les travaux et le matériel d'études, de rechercher une nomenclature commune, de profiter de résultats acquis dans une branche donnée et d'ouvrir de nouveaux horizons.

Nous allons essayer de présenter la pâte de farine de froment comme

(1) Depuis 20 ans en France, une seule fois les blés de la récolte 1950 ont montré une nette déficience en amylase. Par contre on signale plus fréquemment des blés hyperdiastasiques (récoltes 1951-1954-1956-1957).

un cas rhéologique. En effet, la pâte de farine de froment correspond bien à la définition de REINER (14). Ce n'est ni un solide ni un liquide (c'est un corps « mou ») et l'on peut étudier son écoulement et sa déformation, c'est-à-dire faire de la rhéologie.

A. — Constitution de la pâte.

Lors du pétrissage, l'eau se mélange intimement aux particules de farine.

La *dimension moyenne des particules* de farine est inférieure à 0,1 mm (75 microns environ pour les farines françaises). Ces petites particules peuvent, cependant, contenir plusieurs milliers de granules d'amidon enchassés à l'intérieur des matières azotées qui, à l'intérieur des cellules, jouent le rôle de ciment. Les autres substances qui ne présentent qu'un très faible pourcentage (inférieur à 5 p. 100)sont en parties adsorbées aux colloïdes (matières minérales). On les trouve aussi liées dans des complexes analogues à celui du gluten et des lipides, ou simplement dispersées moléculairement.

La constitution de la pâte sera déjà ébauchée si l'on peut préciser comment *l'eau mouille* les protides et l'amidon.

Les molécules d'eau sont adsorbées par les surfaces hydrophiles des protides et de l'amidon.

En ce qui concerne *l'amidon*, il est capable d'adsorber, à température ordinaire 35 p. 100 d'eau. Si l'on prend comme surface de l'amidon les 2 000 cm^2/g calculés par STAMBERG (18) l'épaisseur du film d'eau serait aux environs de 2 microns, mais en fait l'eau pénètre à l'intérieur du granule et l'épaisseur de la couche superficielle est considérablement plus mince.

On peut concevoir les molécules des *protéines* sous forme de longs chapelets ou aplaties ou sous forme de granules. Il semble que dans le gluten les molécules soient associées en *fibrilles*. Dans la pâte, ces fibrilles forment un réseau à 3 dimensions englobant les granules d'amidon. L'eau y est adsorbée de la même manière et en même pourcentage que sur l'amidon. L'épaisseur du film d'eau est beaucoup plus mince car le diamètre des molécules des protides est presque mille fois plus faible que celui des granules d'amidon. De plus, le gluten, même essoré, retient mécaniquement dans son réseau des quantités d'eau beaucoup plus grandes.

Le calcul et la pratique montrent, qu'il faut un minimum de 7 à 8 p. 100 de protéines, pour que le réseau glutineux puisse enrober tous les granules d'amidon (1).

(1) Les travaux de MARKLEY (1938) (13) et ceux de FINNEY cités par SWANSON (1943) (19) montrent que chaque milligramme de gluten doit couvrir environ 20 cm^2 de granules d'amidon. Lorsque la farine contient 7 p. 100 de gluten au moins le film de gluten entourant l'amidon aurait une épaisseur de 0,370 micron à l'état sec. Le film de gluten hydraté est plus épais mais on n'a pas déterminé son épaisseur.

L'épaisseur du film d'eau autour des chaînes macro-moléculaires correspond à une superposition d'un très grand nombre de molécules d'eau. Les premières couches de molécules en contact avec les surfaces macro-moléculaires sont fortement adsorbées et n'ont aucune liberté, mais ces forces d'adsorption décroissent rapidement et les couches externes ont de plus en plus de mobilité et sont surtout maintenues par les forces de cohésion de l'eau (il suffirait pour apprécier ces forces de capillarité, d'imaginer des tubes capillaires de diamètre analogue aux dimensions du réseau).

L'hydratation des particules de farine forme 2 *phases continues* l'eau et le gluten, au sein desquelles l'amidon hydraté est dispersé ;

Le pétrissage amenant au contact les particules protéiques hydratées les fait adhérer, les fibrilles de gluten s'adsorbant l'une l'autre.

En même temps, une quantité d'air importante 20 p. 100 en volume) va être dispersée dans la pâte et constituer une nouvelle phase discontinue. (Baker et Mize (2) indiquent 1,25 pour la densité de la pâte pétrie sous vide et 1,00 pour la densité de la pâte pétrie à l'air libre).

La formation de gaz carbonique (présence de levure biologique ou chimique) fera de la pâte une écume très complexe et très résistante.

L'action des constituants de la farine pondéralement secondaires, et celle des ingrédients ajoutés, pourra souvent s'expliquer partiellement par leur action directe sur l'eau de la pâte.

Compte tenu de l'affinité pour l'eau des divers constituants de la pâte, un pourcentage d'eau minimum de 35 p. 100 est nécessaire pour la formation d'une véritable pâte. Une grande partie de cette *eau* est *liée*. On peut admettre qu'au-dessus d'un seuil de 25 p. 100 (coefficient de Nicloux de 1,33) l'eau a une liberté suffisante pour permettre aux pâtes d'acquérir certaines propriétés mécaniques). Le manque d'hydratation des pâtes fermes ou l'excès d'eau des pâtes liquides suffira à expliquer leurs différences de qualité. Dans le dernier cas, *l'eau supplémentaire* est entièrement *libre* et communique aux pâtes molles *leur grande mobilité*.

B. — Caractéristiques des pâtes.

La constitution de la pâte, lui communique quelques propriétés des solides, puisque le gel gluten constitue la phase dispersante continue, mais ces propriétés seront profondément modifiées par les propriétés inhérentes aux liquides et même au gaz. La dispersion de l'amidon dans la phase continue complique encore le phénomène, car la suspension d'amidon au cours du travail de pétrissage oppose une résistance croissante.

Nous allons présenter quelques propriétés rhéologiques des pâtes de farines de froment en langage ordinaire et en faisant appel le moins

possible au langage mathématique ; ce dernier aiderait beaucoup par sa précision, mais se compliquerait rapidement par l'emploi du calcul tensoriel et matriciel. Nous essaierons de rattacher les concepts de notre spécialité aux termes fondamentaux de rhéologie en voie de normalisation (1).

I. — La Viscosité — Fluidité — Mobilité.

Une boule de pâte que l'on laisse reposer s'aplatit et fait preuve comme les liquides de la propriété de « couler ».

Les céréalistes admettent donc qu'il y a, dans la pâte comme dans les liquides, une résistance interne à l'écoulement.

Les protides et l'amidon adsorbent de l'eau. Les couches inférieures au contact avec la surface des colloïdes n'ont aucune liberté (d'après BUDGET (1911) (3) l'effort de tension nécessaire pour rompre un film d'eau est de l'ordre de 60 atmosphères. Une telle force si elle était généralisée, devrait communiquer à la pâte une rigidité analogue à celle du bois. Mac. BAIN et ALEXANDER (1931) (12) indiquent des forces 15 fois plus faibles). Les couches supérieures ne sont maintenues que par la cohésion de l'eau. Cette force empêche les molécules de se séparer, mais leur laisse un grand degré de liberté. C'est ce qui donne à la pâte sa *mobilité*.

La viscosité des pâtes sera dûe à l'épaisseur des films d'eau et par conséquent sera modifiée par la quantité et la qualité des protides.

Pour une même adsorption d'eau, l'épaisseur du film d'eau sera plus faible avec les fortes teneurs en protides. La pâte sera plus rigide. Il ne faut pas oublier que dans les pâtes complexes certaines actions sur les pâtes de corps ajoutés ne seront que le reflet de leur action directe sur l'hydratation du milieu.

Toutes les substances susceptibles de modifier les attractions intermoléculaires modifieront la viscosité, et les différences d'affinité des surfaces entre elles peuvent augmenter la friction interne.

Le coefficient de friction interne ou viscosité dynamique

$$\eta = \frac{\text{force appliquée/cm}^2}{\text{vitesse d'écoulement}} = \frac{S}{-\,d\sigma/dt} = ML^{-1}T^{-1} \qquad \text{dynes/cm}^2\text{/sec/ou poises}$$

Dans ses expérimentations SCOTT-BLAIR (15) mesure pratiquement la viscosité en déformant pendant un temps t un cylindre de pâte sous une force d'extension supérieure à 5000 dynes/cm² et en mesurant la vitesse d'élongation plastique.

$$\eta = S \Big/ \frac{l_3 - l_1}{l_1} \Big/ t = \frac{S \cdot t}{\frac{l_3 - l_1}{l_1}}$$

l_1 : longueur initiale de la pâte
l_2 : longueur de la pâte tendue
l_3 : longueur après suppression de la contrainte

Cette viscosité de pâte n'est nullement constante et cette viscosité et la vitesse d'élongation plastique sont des moyennes.

Il est indispensable de préciser les forces mises en jeu et les déformations obtenues.

La viscosité des pâtes décroît avec la *température*. HALTON et SCOTT-BLAIR (9) ont observé que la viscosité s'abaissait de 10 p. 100 lorsque la température croissait de 1°C.

La *fluidité ou mobilité* est l'inverse de la *viscosité*.

$$1 \text{ rhé} = \frac{1}{1 \text{ poise}}$$

II. — Plasticité.

La viscosité normale ou newtonienne d'un véritable fluide est indépendante du taux de variation de la vitesse d'écoulement. La plasticité semble donc plus caractéristique des pâtes. SCOTT-BLAIR (17) définit la plasticité.

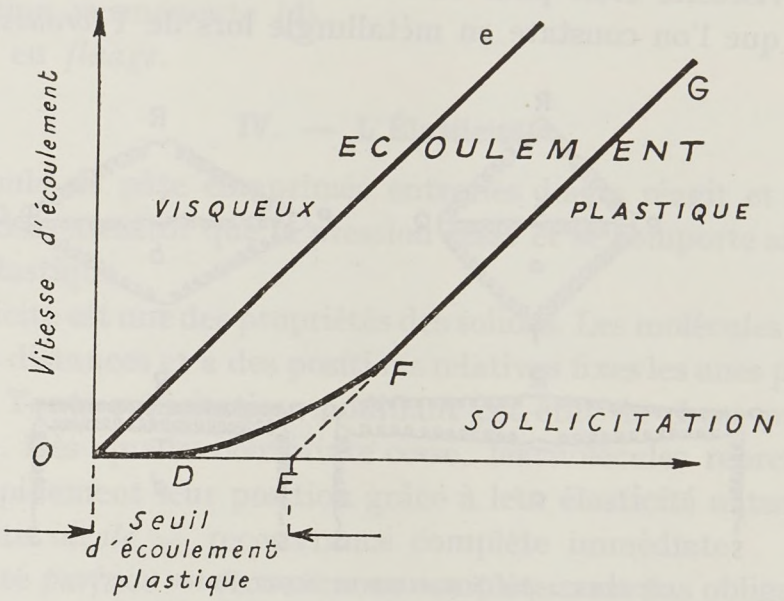


SCHÉMA 1.

« La possibilité pour un matériau moulé de conserver sa forme en resistant aux forces de gravité.

C'est aussi :

« La possibilité pour un matériau d'être déformé d'une manière continue et permanente sans rupture dès que l'on applique une force qui dépasse le « yield value » ou *seuil « d'écoulement plastique »* du matériau (l'argile, le mastic, sont plastiques...) »

Comment différencier la viscosité de la plasticité?

La viscosité n'est qu'un des éléments. Les liquides s'écoulent sous leur propre poids, mais il faut que la sollicitation atteigne une certaine

valeur (*le seuil d'écoulement plastique*) pour déformer les corps plastiques ; dès que l'écoulement est amorcé, tout se passe comme dans un liquide visqueux.

SWANSON (19) imagine un diagramme simple pour montrer la différence entre les écoulements visqueux et plastiques (*schéma n° 1*).

Le facteur temps a une grande importance et les déformations lentes sont généralement plus plastiques.

La différence entre la viscosité et la plastique des pâtes n'est pas toujours très apparente car ces caractéristiques peuvent être modifiées par l'élasticité.

III. — Viscosité de structure et Écrouissage — Fluage.

Le parallélisme entre les écoulements visqueux et plastique n'est pas entièrement respecté dans la pâte et ainsi que dans beaucoup de matériaux, on constate que :

— la viscosité décroit sous de fortes contraintes révélant une *viscosité de structure*.

— la viscosité croît pour de fortes extensions d'une manière analogue à ce que l'on constate en métallurgie lors de l'*écrouissage*.

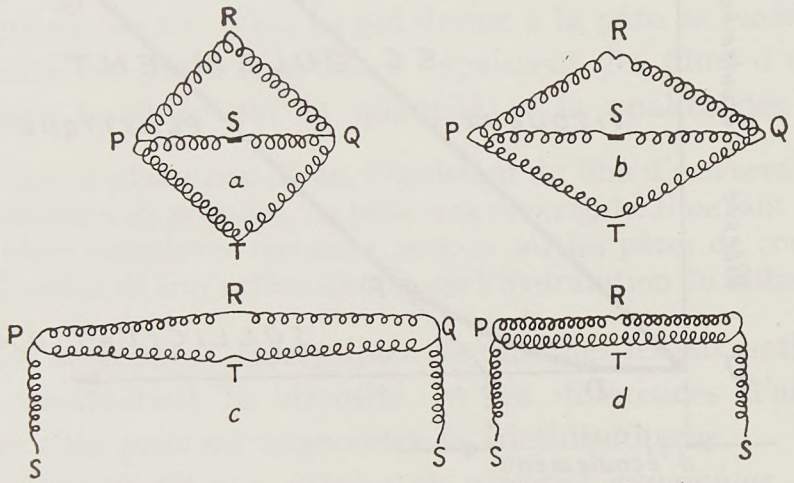


SCHÉMA 2 par SCHOFIELD et SCOTT BLAIR (1937)

L'arrangement et l'orientation des protéines pour former le réseau glutineux est l'un des facteurs principaux de la *viscosité de structure* Ce caractère bien spécial entraînera également des propriétés élastiques (1).

La *viscosité de structure* est donnée par la relation entre la vitesse avec laquelle la viscosité décroît et l'accroissement de la sollicitation.

HALTON et SCOTT BLAIR (9) chiffrent les viscosités de structure par le rapport des viscosités mesurées sous des forces variables.

$$\text{viscosité de structure} = \frac{\eta_1 \ 1000 \text{ dynes/cm}^2}{\eta_1 \ 2000 \text{ dynes/cm}^2} \quad \textit{Résultats} \begin{cases} 1{,}3 \text{ très bons} \\ 1{,}6 \text{ médiocres} \end{cases}$$

(1) Les appareils du 4e groupe éliminent les effets de viscosité de structure qui perturbent les résultats de la plupart des appareils des groupes précédents.

Les viscosités de structure sont en corrélation avec un défaut des pâtes : leur « caractère cassant ». Les faibles viscosités étant préférables aux fortes. Plus une pâte aura les caractéristiques d'un fluide réel, moins elle sera courte.

Il est certain que l'*écrouissage* doit affecter également ce caractère technologique des pâtes. La capacité de rétention du gaz carbonique durant la fermentation semble dépendre entre autres de l'écrouissage.

Le fluage dans les pâtes de farine de froment peut-être représenté par un modèle de 6 ressorts imaginés par SCHOFIELD et SCOTT BLAIR (1937) (16).

où les liaisons des ressorts en P et Q sont fortes

et où en R ST elles sont faibles.

La longueur des ressorts PS et SQ est 2 fois plus petite que celle des 4 autres PR RQ QT TP.

Sous une faible sollicitation (b) les liaisons tiennent et on revient à la formation originelle (a).

Une sollicitation plus forte (c) rompt la liaison en S et il en résulte une élongation permanente (d).

Il y a eu *fluage*.

IV. — L'Élasticité.

Une boule de pâte comprimée entre les doigts réagit et reprend sa position initiale aussitôt que la pression cesse et se comporte ainsi comme un solide élastique.

L'élasticité est une des propriétés des solides. Les molécules sont maintenues à des distances et à des positions relatives fixes les unes par rapport aux autres. Toute sollicitation modifiant cet état de chose produit une déformation. Dès que la contrainte cesse, les molécules reprennent plus ou moins rapidement leur position grâce à leur élasticité naturelle.

Elasticité *idéale* = recouvrance complète immédiate.

Elasticité *parfaite* = recouvrance complète mais pas obligatoirement immédiate.

L'origine de l'élasticité des pâtes serait due à la structure spiralée des chaînes de protéines. (On peut imaginer également une structure en éventail).

La déformation élastique que peut supporter le matériau est déterminée par son *module d'élasticité*.

$$n = \frac{\text{contrainte}}{\text{déformation}}$$

Pour les faibles sollicitations la déformation est proportionnelle à la force.

$$\frac{\Delta l}{l} = \frac{S}{n}$$

La pâte ne change pas de volume d'une manière appréciable lors de l'extension. Les déformations au cisaillement et à l'extension sont numériquement les mêmes. Le rapport de POISSON est voisin de 1/2. La force de cisaillement est égale au 1/3 de la force d'extension.

Lors du cisaillement des pâtes le module d'élasticité (module de COULOMB lié à la rigidité du matériau) sera égal au 1/3 du module de YOUNG ou module d'extension.

La pâte n'est pas parfaitement élastique et la déformation à l'extension est partiellement élastique et recouvrable et partiellement plastique et non recouvrable.

Pour mesurer le module d'élasticité des pâtes, SCOTT BLAIR et col. (15) déforment à l'extension une éprouvette cylindrique sous une force de S dynes/cm² :

$$n = S \Big/ \frac{l_2 - l_3}{l_3}$$

l_1 = longueur initiale de la pâte
l_2 = longueur de la pâte lors de l'extension
l_3 = longueur après la suppression de la sollicitation

Le *module d'élasticité n'est pas constant* et SCOTT BLAIR et col. montrent que la recouvrance élastique $\frac{l_2 - l_3}{l_3}$ croît jusqu'à une certaine *extension de la pâte* $\left(\text{avec le « rak » jusque } \frac{l_2}{l_1} = 2\right)$ et que si l'on poursuit l'extension la recouvrance ne croît plus.

La recouvrance élastique est aussi fonction du *temps d'action de la force* (fonction exponentielle inverse du temps exprimé en secondes).

D'après HALTON et SCOTT BLAIR (9) lorsque la *température* croît de 1°C le module d'élasticité n décroît de 5. p. 100.

V. — Temps de relaxation.

Quand la déformation est poursuivie lentement et même au-delà de la limite d'élasticité, les tensions intermoléculaires cessent car les molécules s'orientent lentement les unes par rapport aux autres. On obtient une déformation permanente.

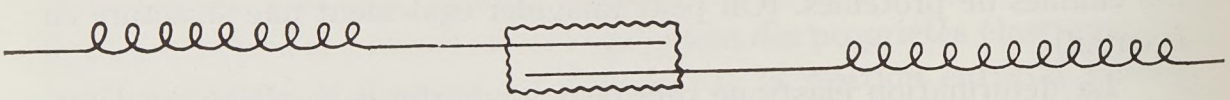


SCHÉMA 3. (Swanson).

Le schéma de ressorts de SCOTT BLAIR (16), ou celui de caoutchouc de SWANSON (19) expliquent que la valeur de l'élasticité dépend des possibilités de glissement de la liaison.

C'est une particularité des matériaux tels que les pâtes où un haut degré de plasticité est combiné avec une élasticité assez faible et variable,

de voir influer la durée d'extension et l'importance de la force, sur la déformation élastique.

L'effort de tension se dissipe graduellement en fonction du temps et, d'après MAXWELL, proportionnellement à la durée.

On essaie de caractériser la déformation élastique par le *temps de relaxatioh de* MAXWELL. C'est l'inverse du facteur de proportionnalité précédent.

Le temps de relaxation tr est le temps nécessaire à la force de tension à laquelle a été soumis le corps pour décroître de 1/e(e = unité d'énergie) de sa valeur initiale de tension S.

On démontre que tr = η/n viscosité/module

(Le rapport de viscosité/module exprimé par SCOTT BLAIR (16) est bien un temps).

Les expériences de SCOTT BLAIR montrent que le temps de relaxation décroît exponentiellement avec la *sollicitation.*

$$t_r = \frac{-\,dt}{d\,(\log_e x)} \left[x = \text{déformation élastique} \neq \frac{l_2 - l_3}{l_3} \right]$$

L'auteur doit en tenir compte pour appliquer la relation de MAXWELL aux pâtes.

SCHOFIELD et SCOTT BLAIR (15) ont montré également que la valeur de ce rapport dépend aussi de l'*importance de la déformation* relative. Plus grande est l'extension, plus importante est la diminution de force de tension correspondante à l'unité de temps de relaxation.

Le *temps de relaxation des pâtes* est peut-être la propriété des pâtes la plus en rapport avec leurs possibilités d'emploi industriel.

En faisant varier *l'hydratation des pâtes* on peut donner à diverses farines, soit la même viscosité η soit le même module d'élasticité n sans leur donner les mêmes possibilités industrielles.

Pour les pâtes boulangères courantes, on remarque de plus grandes variations dans la viscosité que dans le module.

Les farines fortes ont des variations moindres de η et de n que les farines faibles.

Pour *une même viscosité* :

le blé de force Manitoba a le plus faible module.

Le blé faible australien a le plus fort module.

pour *un même module* :

le Manitoba a la plus forte viscosité.

L'Australien a la plus faible viscosité.

Il n'est pratiquement pas possible de faire des pâtes de même $\frac{\eta}{n}$ sans modifier considérablement la viscosité η elle-même.

Les variations de temps de relaxation semblent refléter les variations de qualité et en particulier cette propriété assez difficile à définir qui est

la « réponse » de la pâte aux déformations que lui fait subir le boulanger. Cette « élasticité » est d'autant plus appréciée par le boulanger que le temps de relaxation est plus élevé.

$t_r = \eta_1/n$ = 90 à 100 : très bon — 60 : passable — moins de 30 : médiocre

Le *repos des pâtes* affecte η_1 et n de la même manière que l'hydratation (démonstration expérimentale). La pâte « reposée » est moins cassante.

Au cours de la *fermentation panaire* la viscosité et le module d'élasticité décroissent mais le module décroit moins que la viscosité.

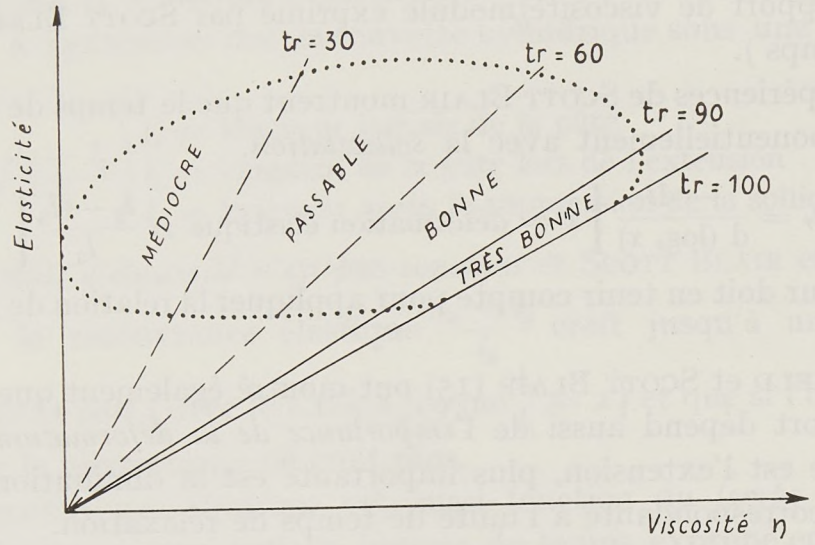


SCHÉMA 4. — Temps de relaxation et qualité des pâtes.
(Les variations de viscosité sont plus importantes que les variations d'élasticité).

Les fortes farines ont une grande viscosité initiale et qui décroît lentement (tr élevé). Les faibles farines ont une viscosité faible qui décroît rapidement (tr faible et décroissant).

Un accroissement de *température* de 1°C diminue la viscosité de 10 p. 100 et le module de 5 p. 100. Le temps de relaxation décroît donc lorsque la température croît.

VI. — Elasticité retardée — Hystérésis.

Ces deux propriétés caractéristiques que l'on rencontre dans les métaux, coexistent également dans les pâtes.

L'*élasticité retardée* est due à l'inhibition des résistances visqueuses entravant l'élasticité,

Lorsqu'une éprouvette de pâte a été étirée, la contraction est d'abord rapide, puis continue ensuite lentement pendant quelques minutes.

L'existence de l'élasticité retardée risque de faire considérer comme plastiques certaines déformations élastiques lorsque le temps de récupé-

ration est insuffisant. C'est une source importante d'erreurs dans le calcul de n et de η.

Extensogrammes après 45-135-180 minutes de repos.

L'hystérésis élastique provoque aussi des variations du module d'élasticité.

Le module diminue régulièrement quand on fait croître ou décroître la force, mais augmente brutalement à chaque changement de sens de la force.

On appréciera l'influence de l'élasticité retardée et de l'hystérésis par la différence entre la viscosité mesurée dans les « rhéogrammes » (1) et celle calculée $\eta = \text{tr. n.}$

C. — Modèle Scott Blair représentant la pâte de farine de froment.

Scott Blair que nous aimons à double titre (pour avoir su créer la rhéologie et pour avoir choisi il y a 20 ans comme 2e spécialité les pâtes de farine de froment) nous enseigne qu'il y a 3 possibilités d'étudier la pâte de farine de froment :

— au niveau macroscopique ;

— au niveau microscopique ;

— et par l'emploi des modèles.

Nous avons modifié un peu son plan en intervertissant les 2 premières études.

Nous avons essayé de débuter à *l'échelle corpusculaire* en imaginant la constitution de la pâte. Les hypothèses indiquées sont fortement étayées scientifiquement et la microcinématographie des pâtes au cours du pétrissage et du repos, contribue à montrer son organisation. Les projets de recherches sur l'essence de la valeur boulangère contribueront, nous l'espérons, à mieux voir le phénomène à l'échelle corpusculaire. Nous pensons même que notre collègue et ami Guilbot pourrait nous faire profiter prochainement de ses études sur l'hydratation des principaux composés biochimiques de la farine, pour nous préciser le rôle de l'eau (quantitativement et qualitativement) dans la formation de la pâte et le développement des principales caractéristiques.

Ensuite, nous avons présenté les observations à notre *échelle ordinaire*, concernant les caractéristiques des pâtes de la façon la plus simple en essayant d'utiliser le vocabulaire ordinaire actuellement en vue de normalisation et sans faire appel au langage mathématique.

Nous profitons du tableau 6 de classification rhéologique de Burgers et Scott Blair (1949) (6) pour y situer la pâte de farine de froment

(1) La méthode des « rhéogrammes » pratiquée par Schofield et Scott Blair (15, 16) consistait à prendre par leur partie supérieure des éprouvettes de pâte et à étudier les déformations produites par leur propre poids.

parmi les autres corps plus ou moins mous, plus ou moins visqueux, plus ou moins élastiques.

Les déformations des pâtes de farine de froment sont à la fois plastiques et élastiques (*déformation plastico-élastique*).

Les courbes de déformation au cisaillement en fonction du temps établies par SCHOFIELD et SCOTT BLAIR en (1933) (15) après une extension de 4 cm d'un pâton, 15 cm de long et 0,7 cm de diamètre durant 200 secondes et après suppression de la contrainte, ne permettent pas d'hésitation, dans la classification de la pâte dans le tableau précédent.

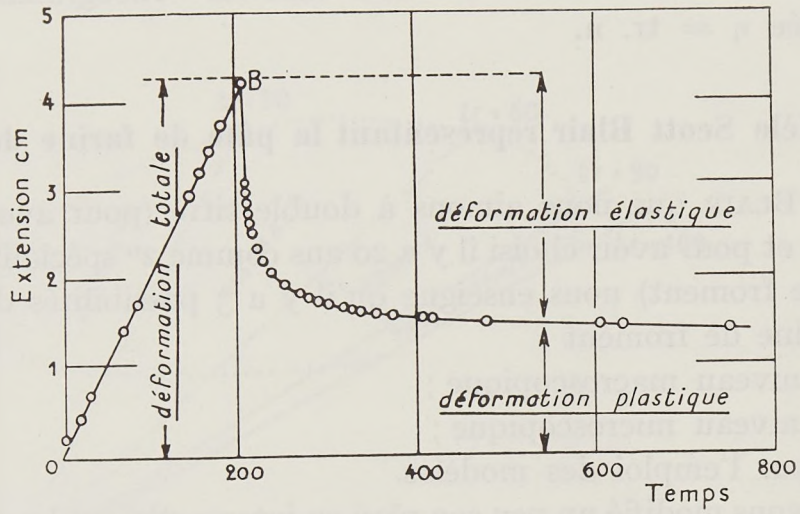


SCHÉMA 7. — (SCHOFIELD et SCOTT BLAIR 1933).

Dans ce même tableau de BURGERS et SCOTT BLAIR nous avons fait figurer les représentations mécaniques et électriques classiques (1) des modèles du liquide de NEWTON (viscosité) du solide de HOOKE (élasticité) du liquide de MAXWELL (élasticité temporaire et temps de relaxation) du solide de KELVIN VOIGT (élasticité retardée).

Les « corps mous » sont des assemblages plus ou moins en série ou en parallèle) de ces représentations classiques élémentaires. SCOTT BLAIR a rendu ainsi classique la représentation des pâtes de farine de froment par un triple assemblage. (Voir tableau 6).

Commençant par :

un solide de KELVIN VOIGT responsable de l'élasticité retardée et déterminant le temps d'équilibre,

— et se terminant par un liquide de MAXWELL,

responsable à la fois d'une élasticité temporaire et d'un écoulement visqueux irréversible — temps de relaxation de la pâte),

— Entre ces 2 corps il dispose un corps de St Venant

(1) L'élasticité est représentée mécaniquement par un ressort et électriquement par une capacité. La viscosité est représentée mécaniquement par un amortisseur et électriquement par une résistance. Les représentations mécaniques sont figurées en trait plein et les représentations électriques en pointillé.

SOLIDE D'EUCLIDE

LIQUIDE DE PASCAL

DEFORMATION

DEFORMATION ELASTIQUE

IDEALE

HOOKIENNE

NON HOOKIENNE

NON IDEALE

PARFAITE

COMPLETE RECOUVRANCE

RECOUVRANCE INCOMPLETE

PLASTO ELASTIQUE

NON BINGHAM

PLASTO INELASTIQUE

BINGHAM

ECOULEMENT

PLASTIQUE

VISQUEUX

VISCO ELASTIQUE

NON NEWTONIEN

VISCO INELASTIQUE

NEWTONIEN

KELVIN · VOIGT

SCOTT BLAIR
Pâte farine froment

Liquide de MAXWELL

valable pour s>op

TABLEAU 6.

responsable des phénomènes de glissement que l'on constate (seuil d'écoulement).

A la fin dans leur compte rendu SCHOFIELD et SCOTT BLAIR (15) traduisent ces faits électriquement.

Ce type de modèle qui peut paraître compliqué est cependant nécessaire pour expliquer le comportement d'une pâte.

CONCLUSIONS

Les problèmes rhéologiques couvrent la plus grande partie de l'activité des industries des céréales.

— depuis le conditionnement et la mouture des grains où il faut déterminer une souplesse suffisante des sons pour permettre de pulvériser l'amande sans briser les enveloppes et où il faut pouvoir aplatir les germes pour les éliminer ;

— depuis la transformation des farines et semoules en pâtes pouvant convenir aux diverses technologies utilisatrices ;

— jusqu'à l'appréciation finale des qualités et des défauts des produits fabriqués. (appréciation de la fraîcheur et du rassissement du pain — appréciation de sa qualité — friabilité des biscuits — élasticité des pâtes alimentaires).

La plupart des données rhéologiques concernant les pâtes de farine de froment, que nous venons de résumer étaient déjà étudiées il y a 20 à 25 ans. Les appareils qui ont été spécialement conçus à cette époque pour mesurer la viscosité et l'élasticité, ont subi peu de perfectionnements (si l'on excepte les améliorations récentes apportées par HLYNKA) (10). Les utilisateurs des pâtes ont peut-être trop considéré ces instruments comme des jouets de savants.

Il semble donc que la rhéologie des pâtes n'ait pas progressé comme on pouvait l'espérer et se soit réduite à des études fragmentaires. Il y a eu davantage de techniciens à faire de la rhéologie, souvent sans le savoir, que d'écoles de rhéologie à appliquer systématiquement cette science.

La méfiance des praticiens avait 2 principales raisons :

— la rhéologie est trop compliquée, trop précise ;

— les caractères rhéologiques sont trop éloignés de la pratique.

H. GREEN (8) donne la première réponse. Il est exact que la rhéologie soit une science compliquée et il est certain qu'elle se compliquera encore de plus en plus au fur et à mesure de ses développements futurs, mais la même critique pourrait être adressée à toutes les sciences utilisées dans le domaine industriel et jugées indispensables (chimie analytique — spectrophotométrie — spectroscopie — microscopie électronique...)

Il est exact aussi, que la rhéologie tende à un degré d'exactitude et de précision plus haut qu'il n'est nécessaire dans la pratique, mais il

n'y a rien à gagner dans la pratique, à préférer à une méthode qui fournit des valeurs absolues, des modes opératoires donnant des résultats relatifs; ce serait antiscientifique.

La solution du 2e problème est plus discutable. On reproche à la rhéologie des pâtes d'avoir peu d'échos dans la pratique. Par exemple si le toucher peut distinguer des variations d'élasticité, il est pratiquement insensible aux variations de pure viscosité.

Le jugement du technicien pour les applications pratiques repose sur ses organes des sens (principalement le toucher et ensuite la vue après éducation par le toucher) et muscles et de plus ce jugement (1) (absolu ou relatif) est également le reflet du goût des consommateurs (il reflète même quelquefois uniquement le goût d'une minorité de clients prodigues de critiques). C'est pourquoi doit se superposer aux études scientifiques, ce que KATZ (11), puis SCOTT BLAIR (17) ont appelé une *Psycho rhéologie.*

C'est pourquoi ce sont les appareils d'appréciation des qualités des pâtes qui ont été mis au point et étalonnés dans les conditions les plus proches de la pratique industrielle, qui ont connu le plus grand succès et la plus grande diffusion (2).

Les utilisateurs connaissent assez bien les possibilités (précision et possibilités d'interprétation) des appareils qu'ils ont choisis et quelquefois adaptés à leur spécialité. Le très grand nombre de travaux effectués grâce à ces divers appareils témoignent des grands services qu'ils ont rendu :

— aux généticiens et aux sélectionneurs pour l'amélioration des variétés de blé ;

— aux meuniers pour la constance des diverses qualités de farines ;

— aux transformateurs de farines aussi bien pour leur fabrication que pour leur rendement quantitatif et qualitatif.

Cependant, les études faites dans un pays ou dans une profession avec un certain appareil sont difficilement comparables à celles obtenues ailleurs avec d'autres appareils.

Combien de fois ne nous a-t-on pas demandé de traduire le W CHOPIN en données BRABENDER (Farinograph — Extensograph et même Amylograph??), en balance qualitative TAUPIN...

Nous avons signalé la diversité des pâtes. Il semble à chaque spécialiste que sa pâte soit unique et incomparable. Dans une même profession, dans la Biscuiterie il semble bien difficile de comparer les pâtes de rotative, de découpeuse, de filière... Il faut reconnaître que jusqu'à

(1) Les impressions perçues sensiblement par le chef de fabrication sont extrapolées et traduites en qualités de pâte qu'il ne peut percevoir et souvent difficiles à définir. D'après une longue enquête il semble que le « *corps* » d'une pâte corresponde par exemple à 4 qualités plus ou moins développées (collante — élastique — coriace — extensible).

(2) L'Alvéographe CHOPIN (version améliorée de l'Extensimètre) connaît depuis près de 40 ans un succès toujours croissant. Le W devient en France une caractéristique officielle des blés et farines. Dans le monde les appareils BRABENDER connaissent aussi la plus grande vogue.

présent, avec l'obsession de l'application pratique immédiate, les recherches (assez rares) ont essayé de comparer empiriquement des pâtes, où étaient rassemblés tous les facteurs de variations possibles et on a effectué cette comparaison avec des appareils dont les données sont complexes et loin d'être bien connues scientifiquement (1).

On comprend bien la difficulté (ou l'impossibilité) de certaines comparaisons.

Les comparaisons si elles sont possibles doivent être faites analytiquement au stade rhéologie et compte tenu des conditions expérimentales d'hydratation de la pâte, de la température...

Nous avons rapporté (4-5) les efforts de certains rhéologistes d'essayer d'interpréter et de chiffrer les données empiriques de quelques appareils en fonction de caractères rhéologiques simples. Récemment HLYNKA (10) étudiant le temps de relaxation dans l'Extensograph Brabender puis dans l'alvéographe CHOPIN a réussi avec de légères modifications dans les modes opératoires (déformations constantes) à passer facilement des données d'un des appareils à celle de l'autre.

L'appareil CHOPIN est de beaucoup le plus utilisé en France et nous terminerons cette conférence en étudiant l'étendue de la gamme des forces boulangères qu'il est capable de nous donner. Le schéma (8) résume les résultats d'une étude comparative de mon collaborateur M. BEGUE des qualités du gluten et des caractéristiques des alvéogrammes des farines de blés français.

Très rapidement les utilisateurs de farine ont découvert la nécessité de compléter la valeur du W CHOPIN par un rapport d'équilibre de la courbe P/G ou P/L. Si l'on admet que l'ordonnée est fonction initialement du module d'élasticité et que l'abscisse est fonction assez lointaine de la viscosité, le rapport de configuration des alvéogrammes serait donc en fonction inverse du temps de relaxation, ce temps de relaxation qui du point de vue rhéologique pur semble le plus caractéristique pour l'appréciation des pâtes.

Le schéma (8) des courbes isodynames peut être partagé en plusieurs secteurs correspondant à divers rapports de configuration d'alvéogrammes et partant à divers temps de relaxation des pâtes.

(1) La force des farines ne saurait se traduire par la seule viscosité , ou par leur seul module d'élasticité. Il faut faire intervenir la plasticité et le seuil d'écoulement, la viscosité de structure, l'écrouissage l'élasticité, l'élasticité retardée et les hystéresis et spécialement le temps de relaxation.

Des phénomènes inverses de la *thixotropie* jouent au cours du pétrissage et du repos. La *perméabilité* de la pâte peut modifier considérablement l'apport de la force de la farine dans l'estimation finale de la valeur boulangère ou valeur biscuitière. (Certains appareils empiriques tels que l'Alvéographe CHOPIN sont sensibles à cette propriété.)

Ces caractères simples doivent être combinés dans des propriétés plus ou moins complexes dont on ignore les relations avec les données rhéologiques élémentaires.

Les appareils couramment utilisés dans la pratique ne reflètent empiriquement que certaines de ces propriétés complexes d'où leurs qualités et aussi leurs points faibles.

Enfin la perméabilité des pâtes n'est pas déductible directement des caractères rhéologiques fondamentaux.

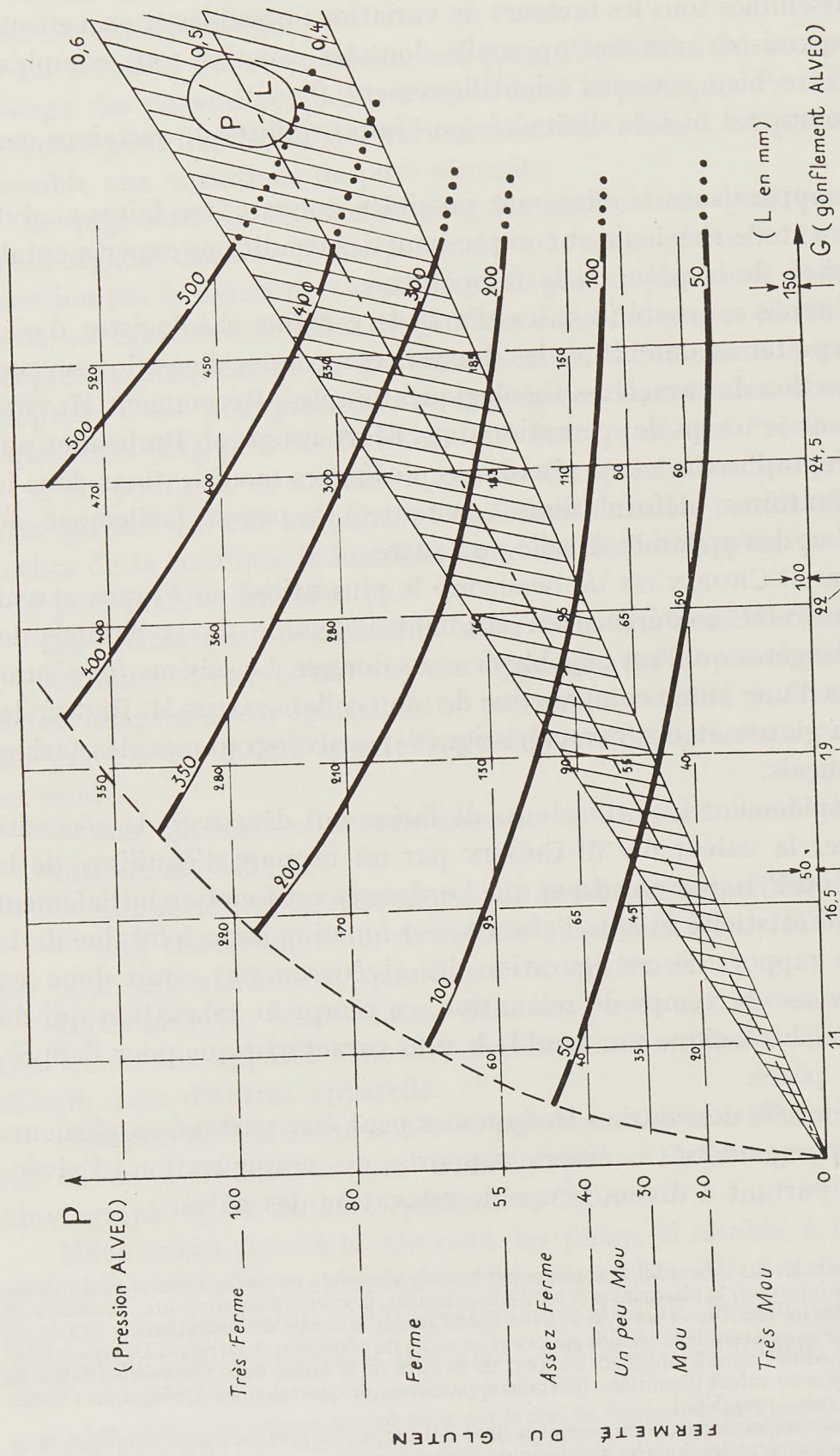


SCHÉMA 8. — Courbes isodynames présentant le même W Chopin.

Si l'on compare le schéma (8) au précédent schéma (4) les différences d'interprétation proviennent des imprécisions concernant les véritables coordonnées des 2 schémas. Les rhéologistes ont été incomplets dans leur interprétation du rapport $\frac{\eta}{n}$ et certainement ce rapport au point de vue valeur technologique des pâtes passe par un optimum et pour $\frac{\eta}{n} > 100$ on devrait constater une baisse de qualité. C'est évident dans le schéma des courbes isodynames. Au-dessus de la zone hachurée groupant les alvéogrammes les mieux « équilibrés » la décroissance de valeur s'explique classiquement par des temps de relaxation insuffisants. Au-dessous on rencontre pratiquement surtout de faibles W, mais leur temps de relaxation très élevé ne rend pas ces farines complètement inutilisables. Leur travail réclame simplement plus de délicatesse. c'est dans cette zone qu'on trouvera même les farines les mieux adaptées à certaines formules de fabrication de biscuiterie relativement peu riches en sucres et en matières grasses ajoutées.

Ces quelques exemples montreront tout l'intérêt que nous devons retirer de la rhéologie, cette science à la fois si ancienne et si nouvelle. C'est elle qui doit nous fournir les éléments pour jeter un pont permettant de franchir les obstacles qui nous empêchent de profiter des résultats concernant les diverses industries des céréales et aussi de ceux plus éloignés des autres groupes d'industries des corps mous.

Les utilisateurs des pâtes de farine de froment ne doivent pas craindre à priori de voir des interprétations mathématiques contribuer à une précision que l'on peut juger actuellement « illusoire ». La rhéologie n'est pas en principe trop compliquée et ne crée pas de complications. Si elle peut apparaître trop théorique, je vous demanderai de vous souvenir d'un proverbe si apprécié non loin de la France.

« Il n'y a rien de plus pratique qu'une bonne théorie ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Projet de définition de quelques termes fondamentaux de la Rhéologie. *Cahier du groupe français d'études de Rhéologie*, **2**, p. 32-37, 1957.
(2) Baker (J. C.) et Mize (M. D.). — Mixing doughs in vacum and the presence of various gases. *Cer. Chem.*, **14**, 721-734.
(3) Budget (H. M.). — The adherence of flat surfaces. Proc. Royal, Soc., London, A, **86**, 26, 1911.
(4) Bure (J.). L'appréciation des qualités plastiques des pâtes de farine de froment 50 p., 40 fig., 4 tabl. — Ed. C. P. T., 1573, Mo Chimie, Paris, 1946.
(5) Bure (J.). — Les pâtes. C. P. T. *Biscuiterie*, p. 49-69 - 1955.
(6) Burgers et Scott Blair (G. W.). — Report on the principles of Rheological nomenclature. Congrès International — Amsterdan, 1949.

(7) FINNEY (Karl F.). — Chiffres non publiés mais cités par SWANSON (C. O.) 1943.
(8) GREEN (H.). Industrial Rheology and Rheological structures Ed. G. WILLEY § Son — New-York, 1949.
(9) HALTON (P.) et SCOTT BLAIR (G. W.). — A study of some physical properties of flour dough. In relation to their bread making qualities. *Cer. Chem.*, **14**, 201-219, 1937.
(10) HLYNKA (I.). — Structural Relaxation in dough. *Cer. Chem.* depuis 1952, publie chaque année les « chapitres » de cette importante recherche.
(11) KATZ (D.). — Studies on Test Bakings *Cer. Chem.*, **14**, 382, 1937.
(12) MAC BAIN (J. W.) et ALEXANDER (J.). — *Colloïd Chemistry* Vol. III — Cohesion an adhesion, p. 9-26 Ed. the Chem catalog C° Inc. — New-York, 1931.
(13) MARKLEY (Max C.). — The Colloidal behavior of flour doughs *Cers. Chem.*, **15**, 317-326, 438-444, 708-711, 1938.
(14) REINER (M.). — Rhéologie théorique. Ed. française DUNOD, 1955.
(15) SCHOFIELD (R. K.) et SCOTT BLAIR (G. W.). — The relation between viscosity, elasticity and plastic strenght. of soft material as illustrated by some, mechanical properties. of flour dough. *Proc. Roy Soc.* — London A, **141**, 72-85, 1933.
(16) *id Proc. Roy Soc.* — London A, **160**, 87-94 — 1937.
(17) SCOTT BLAIR (G. W.). — An Introduction to industrial Rheology. Ed. Blakiston's § Son § C° Inc. — Philadelphia — 1938.
(18) STAMBERG (O. E.). — Studies on wheat Starch *Cer. Chem.*, **15**, 769 — 1939.
(19) SWANSON (C. O.). — Physical Properties of dough. Burgess Publishing C° — Minneapolis-Minn. — 1943.

LES CONDITIONS D'OXYDATION DE L'ACIDE ACÉTIQUE par *ACETOBACTER RANCENS*

PAR

P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles.

PASTEUR a découvert que la bactérie acétique, qu'il avait isolée du vinaigre, était capable d'oxyder l'acide acétique en gaz carbonique et en eau. Il avait été surpris par le fait qu'elle oxydait tantôt l'alcool, tantôt l'acide acétique : « exclusivement le second si le premier est absent, exclusivement le premier malgré la présence du second, tant que le premier ne fait pas défaut » (1).

On s'est aperçu par la suite, que toutes les bactéries acétiques ne possédaient pas cette propriété et les classifications, depuis celles de BEIJERINCK en 1898, ont utilisé ce caractère pour différencier les espèces. Dans la classification de BERGEY, c'est même le critère primordial qui permet de séparer deux grands groupes dans le genre, selon que les espèces oxydent ou n'oxydent pas l'acide acétique. FRATEUR a indiqué que ce caractère était nuancé d'une souche à l'autre, et qu'il existait des cas limites où il était difficile à saisir (2).

Cette difficulté, nous l'avons aussi rencontrée lors de l'identification des bactéries acétiques isolées du vin. D'après nos expériences, des souches incapables d'oxyder l'acide acétique dans un milieu à l'eau de levure, en deviennent capable lorsqu'on y ajoute un peu d'acide succinique (3).

Les recherches entreprises par FEDERICO et ANTONIANI (4), montrent que les acides dicarboxyliques : malique, succinique et fumarique, facilitent l'oxydation de l'acide acétique par les *Acetobacter*. Contrairement aux observations de PASTEUR, ils ont trouvé que même en milieu acide, pH = 3, l'oxydation de l'acide acétique peut être simultanée ou consécutive à l'oxydation de l'alcool.

L'oxydation de l'acide acétique a toujours été considérée comme un accident possible en vinaigrerie. Son danger est cependant exagéré dans l'esprit des praticiens. Elle se produit rarement dans les stocks de vinaigre

et elle y est toujours très limitée. Dans les générateurs à copeaux, rien ne prouve que le gaz carbonique, que l'on retrouve parfois en quantités importantes, provienne directement de l'oxydation de l'acide acétique. Dans la production de vinaigre par cultures immergées, il ne nous a pas été possible de la constater, même plusieurs heures après la disparition de l'alcool.

Ceci s'explique par les expériences de WIAME et LAMBION (5), qui ont démontré que l'oxydation de l'acide acétique est conditionnée en grande partie par le pH du milieu de culture. Elle devient presque impossible lorsque le pH est inférieur à 4.

Il nous a donc semblé intéressant de rechercher si le système enzymatique responsable de l'oxydation de l'acétate n'était pas adaptatif et de préciser dans quelles conditions il apparaît.

Techniques

La souche utilisée, isolée du vin, appartient à l'espèce *A. rancens* Beijerinck, d'après les tests d'identification de Frateur.

Elle a été cultivée sur le milieu suivant :

PO_4H_2K	5 g
$SO_4Mg, 7\ H_2O$	0,150
$SO_4Mn, \ H_2O$	0,030
$SO_4Fe, 7\ H_2O$	0,030
Autolysat de levure Byla	1 g
Eau	1 l.
pH ajusté à 7	

Après chauffage de 20 minutes à 120°, filtration, le milieu est stérilisé 20 minutes à 110°. L'alcool est ajouté ensuite à raison de 2,2 ml. d'alcool à 95° par litre de milieu. La quantité d'acide produite est suffisamment faible pour que le pH du milieu ne descende jamais au-dessous de 6.

La culture est réalisée dans un cylindre contenant 500 ml de milieu et dont le fond en verre fritté porosité n° 3, permet l'insufflation d'air. Température maintenue à 28°.

Les déterminations suivantes ont été faites au cours de la culture :

— Alcool après distillation, par oxydation chromique.

— Acide acétique après entrainement à la vapeur d'eau, par acidimétrie.

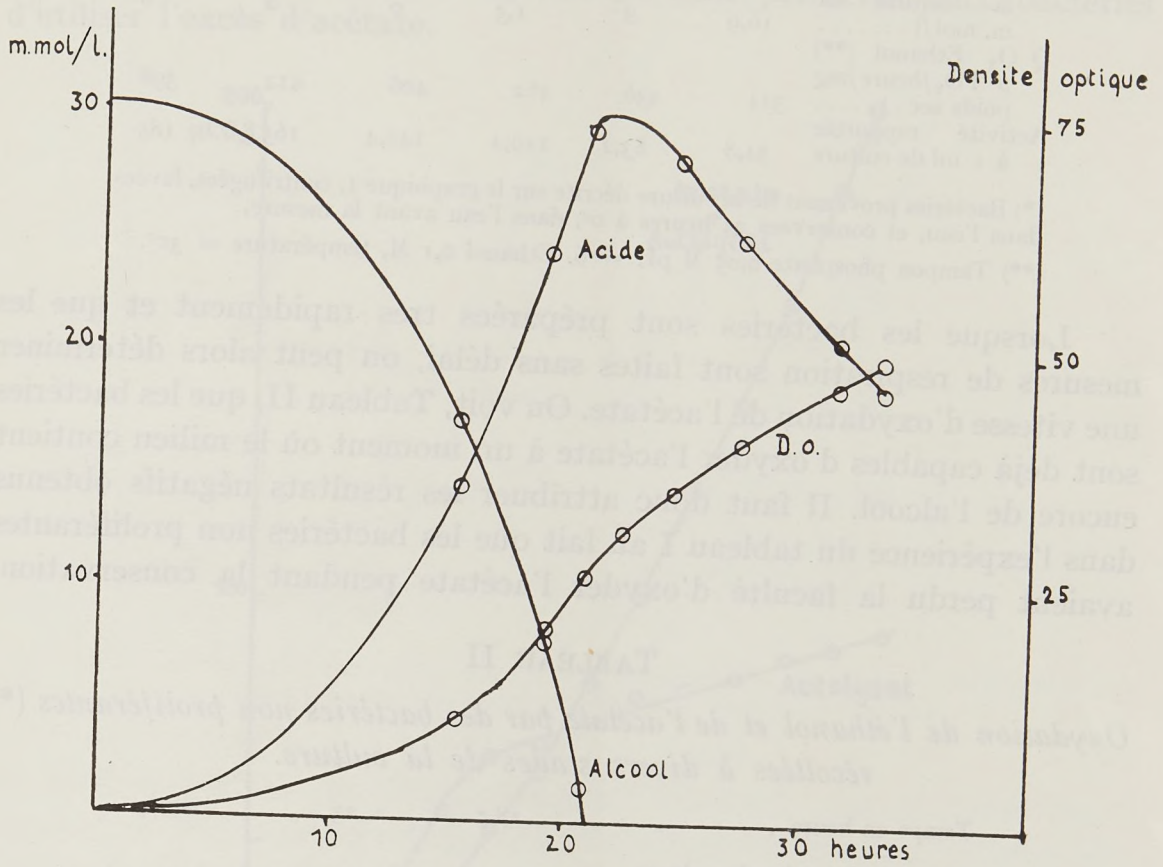
— Densité optique ou photocolorimètre Bonnet-Maury, filtre 15, cuve 1 × 1 cm.

Les bactéries contenues dans 25 ml. de milieu sont récoltées par centrifugation, lavées avec de l'eau et remises en suspension dans 4 ml. d'eau. La respiration est étudiée par la méthode de Warburg, en présence de potasse, dans des conditions indiquées lors de chaque expérience.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Adaptation pendant la culture

Le graphique I représente le déroulement d'une fermentation acétique dans les conditions que nous avons indiquées. On s'aperçoit que la croissance des bactéries et la production d'acide acétique, sont deux phénomènes qui se poursuivent parallèlement suivant une loi exponentielle. La consommation de l'alcool n'est pas fréinée par le fait que sa concen-



GRAPHIQUE I. — Evolution de l'acidité, l'alcool et la densité optique dans une culture d'A. rancens.

tration diminue. Lorsqu'on poursuit la culture après disparition de l'alcool, on observe que les bactéries continuent à croître plus lentement et d'une manière non exponentielle au dépens de l'acide acétique.

L'oxydation de l'acide acétique atteint d'emblée sa vitesse maximum dans la culture. Elle se maintient constante puis décroît bien que les bactéries aient continué à se multiplier. Elle ne commence dans la culture que lorsque tout l'alcool a disparu. L'étude de la respiration des bactéries non proliférantes, récoltées à divers stades de la culture, montre que le système enzymatique responsable de l'oxydation de l'alcool continue à être synthétisé lorsque l'alcool a disparu (tableau I). Ce système est donc bien un enzyme constitutif de la bactérie. Par contre le système enzy-

matique responsable de l'oxydation de l'acétate n'a pu être mis en évidence à aucun stade de la culture dans les bactéries non proliférantes conservées 24 heures dans de l'eau.

TABLEAU I

Oxydation de l'éthanol par des bactéries non proliférantes (*) récoltées à divers stades de la culture.

Temps en heure....	15,25	19	20,75	24,50	27,25	31,50
Ethanol présent dans la culture en m. mol/l	16,9	8	1,5	0	0	0
Q O_2 Ethanol (**) µ l O_2/heure/mg poids sec	314	436	462	406	412	398
Activité rapportée à 1 ml de culture	34,8	83,2	119,4	142,4	165,8	185

(*) Bactéries provenant de la culture décrite sur le graphique 1, centrifugées, lavées dans l'eau, et conservées 24 heures à 0°, dans l'eau avant la mesure.

(**) Tampon phosphate 0,05 M pH = 6. Ethanol 0,1 M, température = 30°.

Lorsque les bactéries sont préparées très rapidement et que les mesures de respiration sont faites sans délai, on peut alors déterminer une vitesse d'oxydation de l'acétate. On voit, Tableau II, que les bactéries sont déjà capables d'oxyder l'acétate à un moment où le milieu contient encore de l'alcool. Il faut donc attribuer les résultats négatifs obtenus dans l'expérience du tableau I au fait que les bactéries non proliférantes avaient perdu la faculté d'oxyder l'acétate pendant la conservation.

TABLEAU II

Oxydation de l'éthanol et de l'acétate par des bactéries non proliférantes (*) récoltées à divers stades de la culture.

Temps en heure	18,5	23	29,75
Alcool présent dansla culture en m. mol/l.....	23,8	1,9	0
Q O_2 alcool (**)	440	330	330
Q O_2 acétate (**)	90	88	130

(*) Conditionss de culture identique à graphique 1. Respiration mesurée immédiatement après la récolte.
(**) Tampon phosphate 0,05 M., pH = 6. Substrat (éthanol ou acétate de Na) 0,1 M t° = 30°

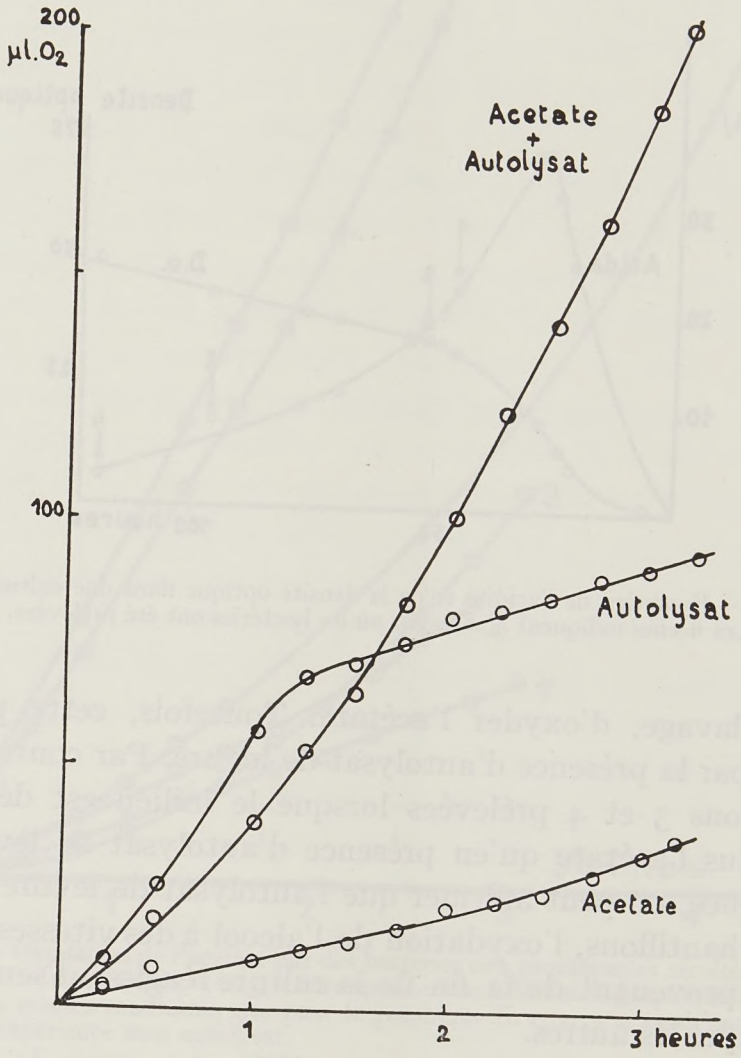
Adaptation des cellules non proliférantes.

Lorsqu'on prélève, au cours d'une culture, des bactéries acétiques et qu'on les lave au tampon phosphate, ou même acétate à pH = 6, on constate qu'elles deviennent rapidement incapables d'oxyder l'acétate. La perte de cette propriété est totale après une heure pour des bactéries récoltées à pH = 3 -4, elle est plus lente si elles proviennent d'un milieu à pH = 6.

Plusieurs moyens essayés pour restaurer cette aptitude chez de telles bactéries se sont montrés sans effets. L'aération en tampon phosphaté 0,05 M pH = 6, et en présence d'acétate de sodium. 0,1 M n'a produit aucun résultat, même poursuivie pendant cinq heures. L'addition des substances suivantes ne les a pas modifiées :

$SO_4(NH_4)_2$	0,25 mg/ml
Pantothénate de Na	0,9 mg/ml
Asparagine	0,5 mg/ml

Lorsqu'on ajoute 8 µ moles d'éthanol dans les fioles de Warburg, on constate qu'il disparaît rapidement sans permettre aux bactéries d'utiliser l'excès d'acétate.

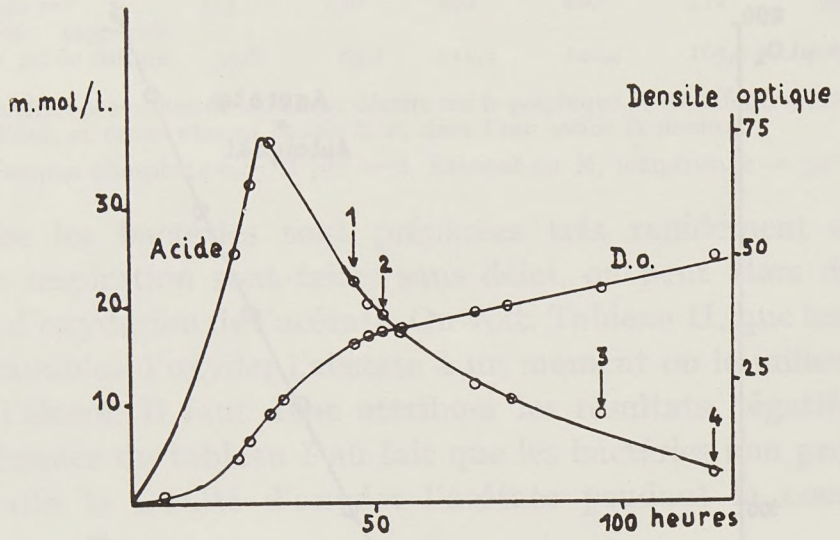


GRAPHIQUE II. — Oxydation de l'acétate par des bactéries non proliférantes. Mesures dans l'appareil de Warburg, température = 30°, Air. Tampon phosphate pH = 6, 0,05 M. Acétate de Na 0,1 M. Autolysat de levure Byla 250 µg/ml. CO_2 fixé par la potasse. Bactéries -0,3 mg par fiole, volume total 2 ml.

Les seuls produits efficaces que nous ayons trouvés, sont des produits complexes tels que le moût de bière, l'autolysat de levure, et l'hydrolysat acide de caséine dépourvu de vitamine (préparation Difco : « Bacto-vitamin free casamino acids »). Le graphique II décrit une expérience réalisée

avec l'autolysat de levure. On peut voir que l'autolysat contient un constituant rapidement oxydable qui est vraisemblablement du glucose. En présence d'autolysat, la vitesse d'oxydation de l'acétate augmente rapidement jusqu'à devenir 6 fois supérieure à ce qu'elle était sans autolysat.

Cette adaptation en présence d'autolysat se manifeste quelle que soit la phase de culture dans laquelle les microbes sont prélevés. Les graphiques III et IV qui se rapportent à la même expérience en donnent un exemple. Les cellules des échantillons 1 et 2 sont prélevées au début de l'oxydation de l'acide acétique dans la culture, elles sont encore capables immédiate-



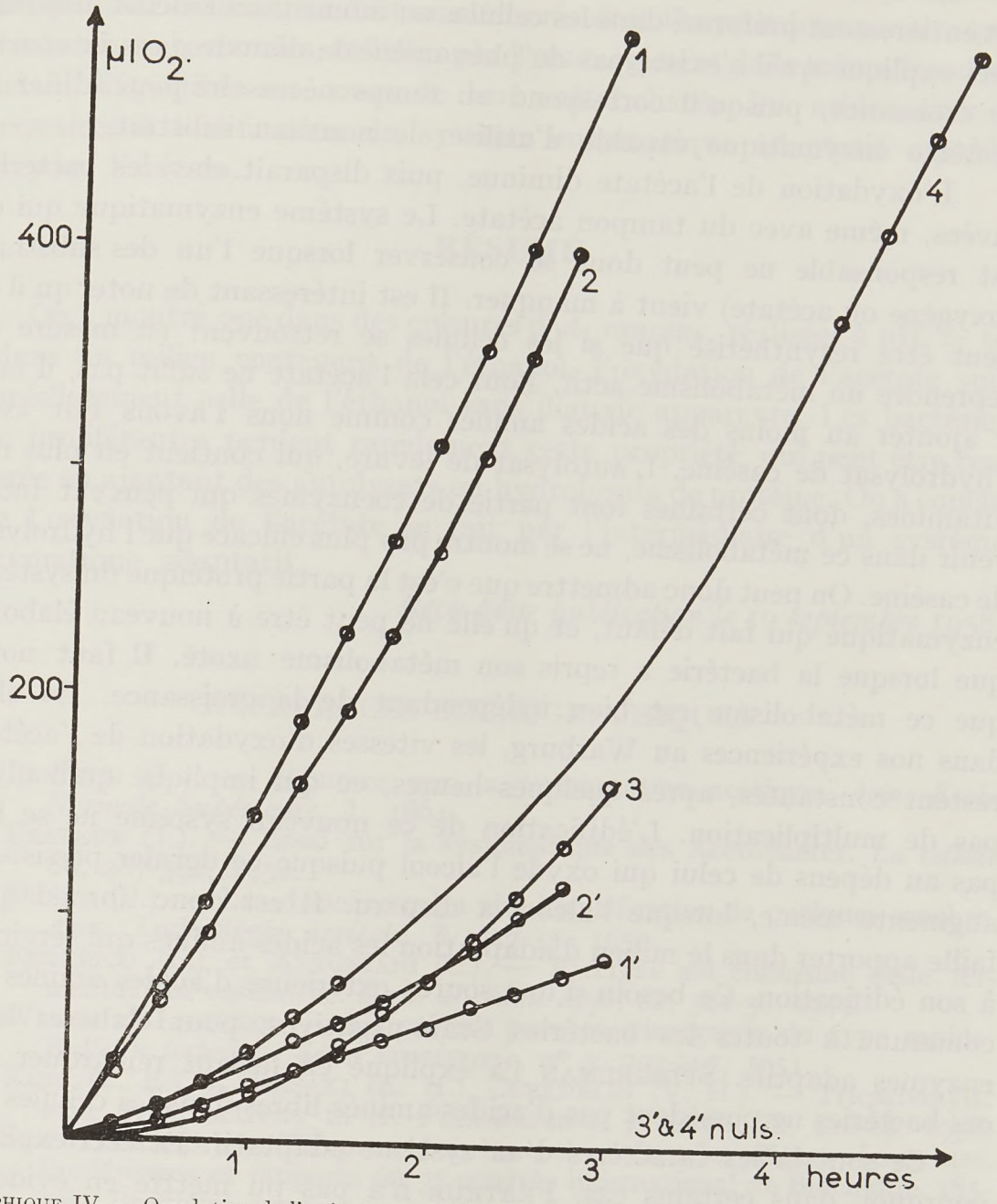
GRAPHIQUE III. — Evolution de l'acidité et de la densité optique dans une culture d'A. rancens. Les flèches indiquent le moment où les bactéries ont été prélevées.

ment après lavage, d'oxyder l'acétate. Toutefois, cette propriété est très exhalté par la présence d'autolysat de levure. Par contre les cellules, des échantillons 3 et 4 prélevées lorsque le milieu est déjà appauvri, n'oxydent plus l'acétate qu'en présence d'autolysat de levure. D'après cette expérience, on peut affirmer que l'autolysat de levure amène, dans les quatre échantillons, l'oxydation de l'alcool à des vitesses voisines. Les échantillons provenant de la fin de la culture réagissent seulement moins rapidement que les autres.

Par broyage des bactéries non proliférantes avec de la poudre de pyrex et extraction dans un tampon phosphate, on peut obtenir un extrait dépourvu de cellules qui se montre capable d'oxyder l'éthanol et l'éthanal, mais il lui est absolument impossible d'oxyder l'acétate. L'addition d'autolysat de levure ne permet pas de restaurer cette faculté.

Un résultat opposé a été enregistré par KING, KAWASAKI et CHELDELIN, (6) qui ont obtenu l'oxydation de l'acétate avec des extraits préparés à partir d'*A. pasteurianum*. Les cellules non proliférantes, bien

que récoltées sur un milieu au glycérol dépourvu d'acétate, se sont montrées capables de l'oxyder, avec une faible activité, $Q\,O_2$ acétate = 67 à pH 6 et 29°.



GRAPHIQUE IV. — Oxydation de l'acétate par des bactéries non proliférantes récoltées à divers stades de la culture. Les suspensions 1, 2, 3, 4 correspondent aux flèches du graphique III. Mesures effectuées dans les mêmes conditions que pour le graphique II. 1, 2, 3, 4 expérience avec autolysat. 1′, 2′, 3′, 4′, expérience sans autolysat.

Discussion.

Au fur et à mesure que l'éthanol est transformé en acétate, *A. rancens* acquiert au cours de la culture la propriété d'oxyder l'acétate. Cette propriété reste potentielle puisque l'acétate n'est pas oxydé tant qu'il reste de l'alcool dans le milieu. Cette constatation est en parfait accord avec ce qu'avait déjà trouvé PASTEUR, elle généralise les résultats à une

espèce différente et à un milieu de culture qui par son pH est extrêmement favorable à l'oxydation de l'acétate.

Le système enzymatique responsable de l'oxydation de l'acétate est entièrement préformé dans les cellules au moment ou l'alcool disparait Ceci explique qu'il n'existe pas de phénomène de diauxie dans la courbe de croissance, puisqu'il correspond au temps nécessaire pour édifier le système enzymatique capable d'utiliser le nouveau substrat.

L'oxydation de l'acétate diminue, puis disparaît chez les bactéries lavées, même avec du tampon acétate. Le système enzymatique qui en est responsable ne peut donc se conserver lorsque l'un des substrats (oxygène ou acétate) vient à manquer. Il est intéressant de noter qu'il ne peut être resynthétisé que si les cellules se retrouvent en mesure de reprendre un métabolisme actif. Pour cela l'acétate ne suffit pas, il faut y ajouter au moins des acides aminés comme nous l'avons fait avec l'hydrolysat de caséine. L'autolysat de levure, qui contient en plus des vitamines, dont certaines font partie de coenzymes qui peuvent intervenir dans ce métabolisme, ne se montre pas plus efficace que l'hydrolysat de caséine. On peut donc admettre que c'est la partie protéique du système enzymatique qui fait défaut, et qu'elle ne peut être à nouveau élaborée que lorsque la bactérie a repris son métabolisme azoté. Il faut noter que ce métabolisme est bien indépendant de la croissance. En effet dans nos expériences au Warburg, les vitesses d'oxydation de l'acétate restent constantes, après quelques heures, ce qui implique qu'il n'y a pas de multiplication. L'édification de ce nouveau système ne se fait pas au dépens de celui qui oxyde l'alcool puisque ce dernier persiste et augmente même, lorsque l'alcool a disparu. Il est donc normal qu'il faille apporter dans le milieu d'adaptation les acides aminés qui serviront à son édification. Ce besoin d'une source extérieure d'acides aminés est commune à toutes les bactéries Gram-négatives, pour élaborer leurs enzymes adaptifs. Spiegelman l'a expliqué en faisant remarquer que ces bactéries ne possèdent pas d'acides aminés libres dans les cellules (7).

Ce sont là les caractères d'un système adaptatif. Et ceci explique pourquoi, dans certains cas, Frateur n'a pas pu mettre en évidence l'oxydation de l'acétate au moyen des oxydogrammes, alors qu'elle apparaissait en culture. Le milieu ne contenant que de l'acétate et de la gélose ne permet pas de conserver l'activité des corps microbiens. On comprend pourquoi il faut lui ajouter de l'eau de levure, qui joue le même rôle que l'autolysat dans nos expériences.

Les expériences de Tosic (8) avec *A. turbidans*, signalent aussi la nécessité d'une adaptation pour permettre aux bactéries non proliférantes, l'oxydation de l'acétate. Cette période peut être raccourcie et la vitesse d'oxydation augmentée par l'addition de certains métabolites tels que lactate, succinate, formiate. Pour cet auteur l'explication la plus pro-

bable est que ces substances simples causent l'activation d'un des enzymes essentiels pour l'oxydation de l'acétate. Nos expériences ont montré qu'un mélange complexe d'acides aminés et de peptides, tel que l'hydrolysat acide de caséine, conduit au même résultat. On peut donc penser, que les substances carbonées, utilisées par Tosic, agissent de la même façon en rendant disponible au cours de leur métabolisme, les acides aminés nécessaires à l'édification du système enzymatique adaptatif capable d'oxyder l'acétate.

RÉSUMÉ

On a montré que dans des cultures d'*A. rancens*, réalisées à pH = 6-7 dans un milieu contenant de l'éthanol, l'oxydation de l'acétate suit immédiatement celle de l'éthanol sans diauxie apparente. Les bactéries non proliférantes perdent rapidement cette propriété, qui peut être restaurée en ajoutant des autolysats ou hydrolysats de protéine. On a conclu que l'oxydation de l'acétate se fait par l'intermédiaire d'un système enzymatique adaptatif.

Reçu pour publication le 19 *septembre* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Pasteur (L.). — Mémoire sur la fermentation acétique. *Ann. Ecole Normale Supérieure*, **1**, 1864.
(2) Frateur (J.). — Essai sur la systématique des Acetobacter. *La cellule* **53**, 287-392, 1950.
(3) Dupuy (P.). — Les *Acetobacter* du vin, identification de quelques souches. *Ann. Technologie agricole*, **6**, 217-33, 1957.
(4) Federico (L.) et Antoniani (C.). — Ricerche sul chimismo delle fermentazioni ossidative. *Ann. di chim. appl*, **33**, 321-30, 1949.
(5) Wiame et Lambion. — La culture pure en vinaigrerie du type rapide. *Bulletin technique de la vinaigrerie*, nº 7, 203-207, 1951.
(6) King (T. E.), Kawasaki (E. H.), Cheldelin (V. H.). — Tricarboxylic acid cycle activity in *A. Pasteurianum*. *J. Bact.*, **72**, 418-22, 1956.
(7) Spiegelman (S.). — The present status of the induced syntheses of enzymes. Conférences et rapports du 3e congrès international de Biochimie. 185-195, Bruxelles 1955.
(8) Tosic (J.). — Oxidations in *Acetobacter*. *The Biochem*, J., **40**, 209-215, 1946.

LES POSSIBILITÉS DE LA MICROVINIFICATION APPLICATION A L'ÉTUDE DE LA MACÉRATION

PAR

M. FLANZY et Ch. POUX

Station centrale de Technologie des produits végétaux, Narbonne.

PLAN DE MEMOIRE

I. — **Introduction.**

II. — **Protocole des essais.**

III. — **Essais du 30 septembre 1957 et du 15 octobre 1957.**

A. Essais du 30 septembre.

Résultats.

a) Examen sommaire.

b) Dégustation.

c) Résultats analytiques.

Interprétation des résultats.

1° Comparaison série « Air » et série « CO^2 ».

Alcool.

Acidité volatile.

Acidité fixe.

pH.

Chromatographie.

2° Action des parties solides du Raisin.

Alcool.

Acidité fixe.

pH.

B. Essais du 15 octobre.

Résultats.

Interprétation des résultats.

IV. — **Matières tannoïdes.**

1° Courbes d'absorption dans l'U. V.

a) Indice de permanganate.

b) Indice spectrophotométrique.

c) Comparaison de la série « Air » et de la série « CO_2 ».

d) Comparaison en fonction des différents matériaux solides du raisin.

2° Courbe d'absorption dans le visible (4 000 A°) à (6 000 A°).

a) Comparaison de la série « Air » et de la série « CO_2 » dans les Vins Rosés et les Vins Rouges.

b) Comparaison en fonction des différents matériaux solides du Raisin.

3° Observations sur le deuxième essai.

V. — **Conclusion.**

VI. — **Bibliographie.**

I. — GÉNÉRALITÉS

Nous désignons par *microvinification* la technique des essais réalisés en laboratoire sur de faibles quantités de raisins, de l'ordre de 1 kg. Rappelons que dans la pratique la masse de raisins encuvés dans les récipients de 100 hl est de l'ordre de 10 000 kg. Cette disproportion justifie le qualificatif « micro » par opposition à la macrovinification.

Le problème fondamental est de savoir jusqu'à quel point les résultats de microvinification sont transposables à la vinification pratique.

Apparemment la fermentation alcoolique des raisins est marquée par trois phases distinctes :

— la phase préliminaire sans dégagement de CO_2 ;

— la phase fermentative proprement dite avec dégagement tumultueux de CO2 ;

— la phase finale où le dégagement de CO_2 est à peine sensible.

Au début de la première phase, la masse des raisins est en contact avec l'air si on ne prend aucune précaution contraire.

En laboratoire les flacons utilisés reçoivent les raisins foulés ou du jus de raisin et sont bouchés simplement soit avec un tampon d'ouate, soit avec un bouchon de liège. Dans ces essais portant sur une masse de matière de l'ordre de 1 kg le rapport :

$$\frac{\text{Masse de raisin}}{\text{surface en contact avec le milieu extérieur}}$$

présente une certaine valeur.

Dans la pratique, avec les grandes cuves de fermentation, ce rapport a une valeur différente. En admettant pour le laboratoire des flacons cylindriques de 1,5 litre de capacité et pour les cuves de fermentation une capacité voisine de 150 hl, ce rapport varie environ de 1 à 10 en passant du laboratoire aux cuves de vinification.

On peut donc supposer, d'une façon assez grossière, mais significative, que dans le premier cas la phase préliminaire définie plus haut se déroule en milieu plus aérobie et, qu'au contraire, dans le deuxième cas, cette phase se développe en milieu plus anaérobie.

Ces distinctions se trouveraient confirmées par les travaux parus sur l'évolution des jus dès leur pressurage [1]. On doit donc émettre l'hypothèse qu'au début, avant toute fermentation visible, les phénomènes biochimiques pourraient ne pas être identiques en passant des essais de laboratoire, tels qu'ils sont couramment réalisés, aux vinifications en grande cuve.

Par ailleurs on ne connaît pas l'influence que peut avoir sur le déroulement des phénomènes ultérieurs une modification de la phase initiale ;

on est donc en droit de s'interroger sur la valeur relative de la microvinification. On pourrait même penser qu'elle ne pourra pas remplacer la macrovinification, obligatoire celle-ci, seule capable de donner des résultats probants.

Mais des considérations d'ordre génétique jouent en faveur de la microvinification. On peut en effet ne disposer dans ce cas que d'une très faible quantité de raisin, de l'ordre du kilogramme ; or, il est fondamental d'être renseigné le plus tôt possible sur la valeur œnologique du cépage créé ou choisi.

Il est donc essentiel de voir dans quelle mesure la microvinification peut donner des résultats valables, assimilables à ceux que donnent la macrovinification. Par analogie, il s'agit de faire pour l'expérimentation ce qui a été fait pour l'analyse qui est arrivée peu à peu au stade microanalyse avec des résultats aussi valables qu'avec la macroanalyse.

Etablir le protocole expérimental susceptible de résoudre le problème ainsi posé est donc le premier but à atteindre.

Les considérations sur l'état d'aérobiose du milieu indiquent déjà le sens des premières recherches. Nous avons pensé que la comparaison entre des flacons fermés, bouchés de la même façon, mais les uns sous la protection permanente d'un courant continu de CO_2 les autres non, pourrait donner des différences significatives.

Ces études pour une technique valable de microvinification ont été l'occasion d'une autre série de recherches ayant pour objet l'influence des différentes parties constitutives du raisin sur la composition et la qualité des vins.

Ainsi a-t-on étudié l'influence des rafles, des pellicules, des pépins.

II. — PROTOCOLE DES ESSAIS

Les essais effectués avec le raisin Carignan ont été faits en double et répétés deux fois dans le temps, avec des raisins issus de la même vigne mais cueillis à deux stades de maturité.

Un des buts de l'expérimentation étant de préciser le rôle des pépins, des pellicules et des rafles, on a rapporté à un même volume de moût, le poids de pépins, de pellicules et de rafles auxquels ils correspondent dans la vendange entière.

Les essais ont été conduits dans des bocaux cylindriques de dimension suivantes : diamètre 110 mm, hauteur 330 mm.

Ces bocaux s'obturaient avec bouchon de liège comportant deux tubulures à dégagement et un tube à essai amovible permettant de maintenir les parties solides immergées dans le liquide en fermentation.

On a préparé six lots comprenant chacun 4 bocaux :

— Le lot 1 était constitué par le moût seul.

— Le lot 2 était constitué par le moût + les pellicules.

— Le lot 3 était constitué par le moût + les pépins + les pellicules correspondant à la vendange égrappée.

— Le lot 4 était constitué par le moût + les pépins.

— Le lot 5 était constitué par le moût + les rafles.

— Le lot 6 était constitué par le moût + les rafles + les pépins + les pellicules (vendange entière).

Dans chaque lot deux bocaux avaient leurs deux tubulures à dégagement constitué par un tube de 5 mm de diamètre obturé par de la ouate, en communication avec l'air.

Ils formaient une série de 12 bocaux constituant ce que nous appelons la *série air*.

Les deux autres bocaux de chaque lot avaient une de leur tubulure à dégagement reliée à une rampe dans laquelle circulait un léger courant de gaz carbonique provenant d'une bouteille (débit une bulle par seconde), l'autre tubulure étant reliée à une autre rampe de sortie des gaz. Cette série de 12 bocaux, balayée par un léger courant de CO_2 formait la *série CO2*.

III. — ESSAIS DU 30 SEPTEMBRE 1957 ET DU 15 OCTOBRE 1957

A. — ESSAI DU 30 SEPTEMBRE 1957

Une masse de 42,500 kg de raisin de Carignan a été égrappée à la main. Elle a donné 39,9 kg de raisins éraflés et 2,4 kg de rafles.

Les 39,9 kg de raisins éraflés pressés sur un petit pressoir ont donné 25 litres de moût, de densité 1084 et un gâteau formé par les parties solides pesant 12 kg. De ces 12 kg, 2 kg de gâteau de parties solides ont donné, après séparation à la main, 1645 g. de pellicules et 200 g de pépins.

Au cours de ces opérations d'éraflage, de pressurage et d'épépinage, il y a eu des pertes de matières inhérentes aux manipulations. Ces pertes peuvent être chiffrées et sont rassemblées dans le Tableau I.

TABLEAU I

	Poids en kg		Pertes	
	Avant	Après	en kg	%
Eraflage	42,5	42,3	0,2	0,47
Pressurage	39,9	39,1	0,8	2
Epépinage	2	1,845	0.155	7,75

Dans chaque série « air » et « CO_2 « les parties constitutives de la vendange ont été réparties dans 12 bocaux numérotés de 1 à 12, selon les proportions suivantes :

Bocaux n° 1 et 2 : 780 ml de moût.

Bocaux n° 3 et 4 : 780 ml de moût ; 317, 5 g de pellicules.

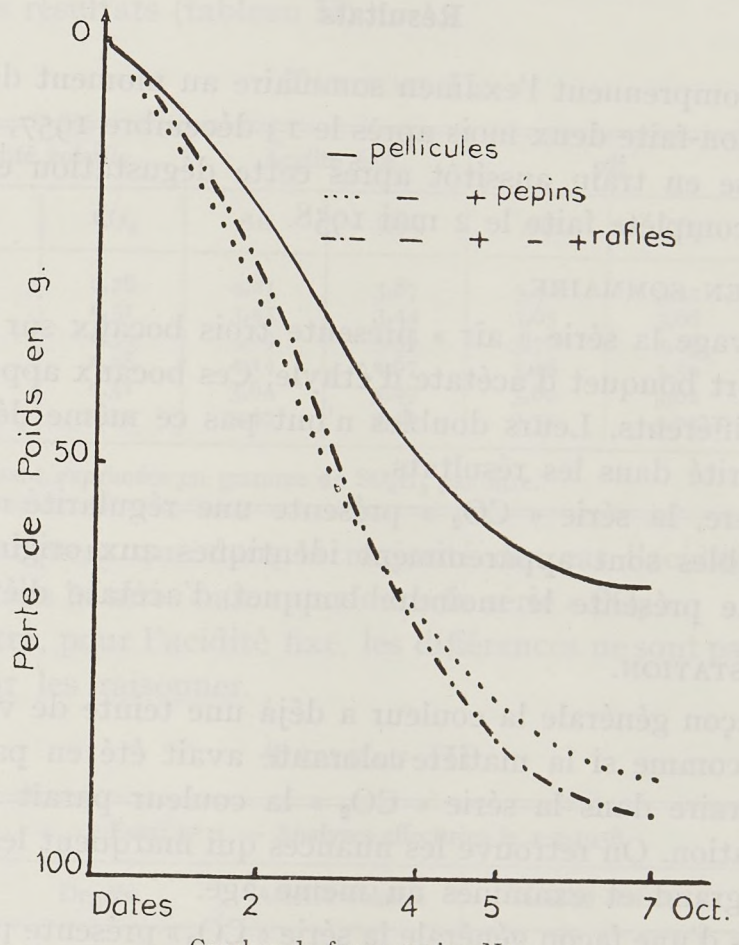
Bocaux n° 5 et 6 : 780 ml de moût ; 317,5 g de pellicule ; 35 g de pépins.

Bocaux n° 7 et 8 : 780 ml de moût ; 35 g de pépins.

Bocaux n° 9 et 10 : 780 ml de moût ; 70 g de rafles.

Bocaux 11 et 12 : 780 ml de moût ; 352,5 g de pellicules + pépins ; 70 g de rafles.

On avait ainsi 24 bocaux en expérience.



Courbes de fermentation N° 1.

Chaque bocal a été ensemencé avec 40 ml d'un levain de levures sélectionnées de l'Institut Pasteur formées de deux souches dénommées « Beaujolais et Pomard » comprenant 90 millions de germes au ml. Ce levain âgé de 48 heures avait été fabriqué avec un moût issu de raisins du même vignoble expérimental cueillis 2 jours à l'avance.

Les milieux n'ont subi aucune addition de SO_2.

Les essais ont été conduits dans une pièce à température uniforme 24°C.

La fermentation s'est déclarée presque immédiatement. Elle a été suivie sur les bocaux de la série « air » par pesée. La courbe n° 1 rend compte de l'allure régulière de cette fermentation.

La fermentation achevée, il a été procédé au décuvage. Le vin obtenu par pressurage des parties solides a été mélangé au vin de goutte : l'ensemble a été mis dans des récipients pleins à l'obscurité dans la cave de la Station.

Le premier soutirage a eu lieu le 13 décembre et il a été procédé à ce moment à une dégustation et à une analyse partielle.

Un deuxième soutirage a eu lieu le 2 mai 1958. Une analyse plus complète des vins a été aussitôt mise en train.

Résultats

Ceux-ci comprennent l'examen sommaire au moment du décuvage. Une dégustation faite deux mois après le 13 décembre 1957, une analyse sommaire mise en train aussitôt après cette dégustation et enfin une analyse plus complète faite le 2 mai 1958.

a) Examen sommaire.

Au décuvage la série « air » présente trois bocaux sur un total de 12 avec un fort bouquet d'acétate d'éthyle. Ces bocaux appartiennent à trois essais différents. Leurs doubles n'ont pas ce même défaut. Il y a donc irrégularité dans les résultats.

Par contre, la série « CO_2 » présente une régularité remarquable. Tous les doubles sont apparemment identiques aux originaux. Aucun échantillon ne présente le moindre bouquet d'acétate d'éthyle.

b) Degustation.

D'une façon générale la couleur a déjà une teinte de vieux dans la série « air », comme si la matière colorante avait été en partie oxydée.

Au contraire dans la série « CO_2 » la couleur paraît n'avoir subi aucune altération. On retrouve les nuances qui marquent les vins jeunes élaborés en grand et examinés au même âge.

Toujours d'une façon générale la série « CO_2 » présente plus de fruité, moins de dureté que la série « air ». Il semble que les vins de cette dernière série soient plus acides.

Dans le détail chaque constituant du raisin a une action nettement marquée.

Les pépins donnent aux vins un bouquet plus accentué et plus de corps, au point que la série pellicule + pépins est meilleure que la série pellicules.

La rafle semble moins donner d'acidité que le pépin. Par contre, alors que l'action du pépin paraît bénéfique sur le plan gustatif, la rafle donne

une saveur caractéristique plutôt déplaisante. Au point que la comparaison entre la série pépins et la série rafles dénote une très grande différence entre les vins correspondants.

Cette différence est même plus marquée qu'entre la série moût et la série pépins.

En définitive les meilleurs vins correspondent a la série pellicules + pépins.

c) Resultats analytiques.

L'analyse sommaire du 23 décembre 1957 ne comprend que les dosages d'acidité, la détermination du pH et l'essai chromatographique malolactique. On a préféré conserver la plus grande masse liquide pour pouvoir faire ultérieurement une analyse aussi complète que possible.

Voici les résultats (tableau II).

Tableau II

N°	Acidité volatile		Acidité fixe		pH		Chromatographie fermentation malolactique
	Air	CO_2	Air	CO_2	Air	CO_2	
2	0,34	0,28	4,21	3,87	3,42	3,41	+
3	0,59	0,31	3,41	3,44	3,65	3,68	+
5	0,31	0,39	3,69	3,56	3,70	3,67	+
7	0,36	0,28	4,14	4,67	3,48	3,50	+
10	0,51	0,31	3,64	3,49	3,60	3,62	+
12	0,61	0,34	3,49	3,41	3,75	3,75	+

Les acidités sont exprimées en gramme de SO_4H_2 par litre.

On remarquera que dans la majorité des cas l'acidité volatile est plus élevée dans la série « air » que dans la série « CO_2 ».

Par contre, pour l'acidité fixe, les différences ne sont pas assez significatives pour les raisonner.

Tableau III

Essai n° 1 — Analyses effectuées le 2-5-1958

N°	Degrés		Acidité volatile		Acidité fixe		pH	
	Air	CO_2	Air	CO_2	Air	CO_2	Air	CO_2
1	11°36	10°06	0,27	0,30	4,03	3,80	3,35	3,32
2	11°36	10°08	0,35	0,27	3,95	3,78	3,35	3,32
3	11°42	10°84	0,53	0,26	3,47	3,24	3,58	3,60
4	11°42	10°94	0,49	0,32	3,51	3,28	3,58	3,60
5	11°38	10°94	0,40	0,30	3,60	3,30	3,60	3,60
6	11°28	10°94	0,41	0,32	3,59	3,28	3,60	3,60
7	11°36	9°80	0,33	0,27	3,97	3,53	3,40	3,38
8	11°28	10°06	0,30	0,24	4,00	3,56	3,40	3,38
9	11°36	9°90	0,55	0,26	3,75	3,19	3,50	3,58
10	11°04	9°88	0,56	0,27	3,74	3,33	3,50	3,55
11	11°00	9°96	0,36	0,31	3,54	3,09	3,68	3,75
12	10°94	10°26	0,67	0,29	3,44	3,11	3,68	3,70

L'analyse du 2 mai 1958 comprend, en dehors des dosages d'acidité, de détermination du pH, du degré alcoolique, le dosage chimique des matières tannoïdes et leur appréciation spectrophotométrique.

Pour bien marquer leur importance dans la distinction des différents types de vin, les documents spectrophotométriques établis à cette occasion et les dosages chimiques font l'objet d'un chapitre particulier sous le nom de « Les matières tannoïdes ».

Les résultats chimiques sont inscrits dans le Tableau III.

Interprétation des résultats.

On doit examiner le cas échéant et comparativement :

1° Chaque échantillon et son double.

2° La série « air » et la série « CO_2 ».

3° L'action des différentes parties.

Tout d'abord la comparaison entre chaque échantillon et son double montre, qu'aux erreurs analytiques près, les résultats sont identiques. On peut donc conclure que les différences trouvées seront bien significatives.

1° Comparaison entre les series « air » et « CO_2 ».

Les comparaisons portent sur le degré alcoolique, les acidités volatile et fixe.

Alcool. — La série « CO_2 » a perdu dans tous les essais une quantité d'alcool moyenne de 0°96 avec des valeurs extrêmes de 1°56 pour le maxima et de 0°34 pour le minima.

Ces pertes sont vraisemblablement dues à un entraînement d'alcool par le courant continu de CO_2. On peut les éviter. En effet si, au début, la mise en charge sous CO_2 de cette série est obligatoire pour réaliser l'état d'anaérobiose recherché, il ne paraît pas nécessaire ensuite de maintenir en permanence le courant de CO_2 ; le CO_2 de fermentation remplira parfaitement cet objet.

Acidité volatile. — La teneur en acidité volatile pour 11 échantillons sur 12 est plus faible dans la série « CO_2 ». La protection du gaz carbonique est très nette ; la différence moyenne pour l'ensemble des échantillons est de 0,15 g avec un maxima de 0,38 g et un minima de 0,06 g,

On pourrait accuser un entraînement par CO_2. Les calculs basés sur la tension de vapeur de CH_3CO_2H montrent que cette perte est à peine de 1/10 de la différence analytique constatée. Il faut donc penser à une cause plus profonde de nature biologique.

Acidité fixe. — Pour tous les échantillons, la série « CO_2 » a une acidité fixe plus faible que la série « air ». La moyenne de la différence est de 0,34 g avec un maxima de 0,56 g et un minima de 0,17 g.

Cette différence étant significative on se trouve en présence d'un

fait important qui pourrait être de nature biologique. Le mécanisme de cette action n'a pas été étudié ici et mériterait une étude particulière.

pH. — La variation de pH entre la série « air » et la série « CO_2 » est trop faible pour en déduire une signification quelconque.

Par Chromatographie sur papier, méthode MACHEBOUEF (2), nous avons observé, dès le premier soutirage que tous les vins aussi bien ceux de la série « air » que ceux de la série « CO_2 » avaient subi la fermentation malolactique. Rappelons qu'il n'y a pas eu addition de SO_2. Le phénomène bactérien malo-lactique dans l'hypothèse d'une action bactérienne, ne doit donc pas surprendre.

2°) ACTION DES PARTIES SOLIDES DU RAISIN.

Nous examinons successivement à ce point de vue, la variation de la teneur en alcool, de l'acidité fixe et du pH.

De plus en ce qui concerne les matières polyphénoliques, nous comparons les spectres d'absorption en Ultra-Violet et visible de différents échantillons dans un autre paragraphe.

Alcool. — Le tableau n° IV donne la variation du degré alcoolique en fonction des éléments solides de la vendange. Ces résultats confirment le fait, maintes fois signalé, de la diminution de la teneur en alcool du vin obtenu par vinification rafle comprise.

TABLEAU IV

Variation de degré alcoolique en fonction des éléments solides de la vendange.

		Essai N°1	Essai N°2
Jus	1-2	11°36	12°74
Jus + Pépins	7-8	11°32	12°73
Jus + Rafle	9-10	11°20	12°62
Jus	1-2	11°36	12°74
Jus + Pellicule	3-4	11°42	13°05
Jus + Pellicule + Pépins	5-6	11°33	12°77
Jus + Pellicule + Pépins + Rafle	11-12	10°97	12°58

Dans l'essai effectué la différence entre ce qui correspond dans la pratique à la vendange éraflée (n° 5 et 6) et la vendange entière (n° 11 et 12) s'élève à 0°36 chiffre plus élevé que ceux ordinairement admis ou observés 0°2.

La part provenant des rafles proprement dites serait dans le même essai de 0°16 (n° 9 et 10) (les essais 3, 4, 5 et 6 comprenant les pellicules épépinées ont subi une concentration au cours de l'épépinage — voir tableau n° I).

Acidité fixe. — Le tableau n° V nous donne la variation de l'acidité fixe dans la série « air » et la série « CO_2 ». On y retrouve le fait déja connu

de l'apport des éléments minéraux par les parties solides et, en particulier, de la rafle.

TABLEAU V

Variation de l'Acidité fixe en fonction des éléments solides de la vendange

Essai N° 1		Air Ac. Fixe	Co_2 Ac. Fixe
Jus	1-2	3,99	3,79
Jus + Pépins	7-8	3,99	3,55
Jus + Rafle	9-10	3,75	3,25
Jus	1-2	3,99	3,79
Jus + Pellicule	3-4	3,49	3,26
Jus + Pellicule + Pépin	5-6	3,60	3,29
Jus + Pellicule + Pépin + Rafle	11-12	3,49	3,10

Ces éléments minéraux à prédominance de potassium permettent dans le vin fait, une précipitation plus grande de bitartrate de potassium qui se traduit en fin de compte par une diminution de l'acidité fixe. Dans l'essai que nous avons effectué cette diminution est de l'ordre de 0,5 g dans la série « air » et 0,69 g dans la série « CO_2 ». C'est donc un phénomène non négligeable.

pH. — Le tableau VI de la variation du pH en fonction des élément solides de la vendange traduit sous une autre forme, le phénomène précédemment décrit, à savoir une différence de plus en plus prononcée lorsque l'on passe des vins issus de la fermentation du mout seul à ceux issus d'une fermentation avec les différents éléments solides du fruit. On voit que pour les cas limites les variations extrêmes peuvent être de 0,38 et 0,43 unités pH. Ce phénomène peut prendre dans certains cas une grande importance en vue de l'accélération d'une fermentation secondaire malolactique qui est comme on le sait fortement influencée par l'élévation du pH.

TABLEAU VI

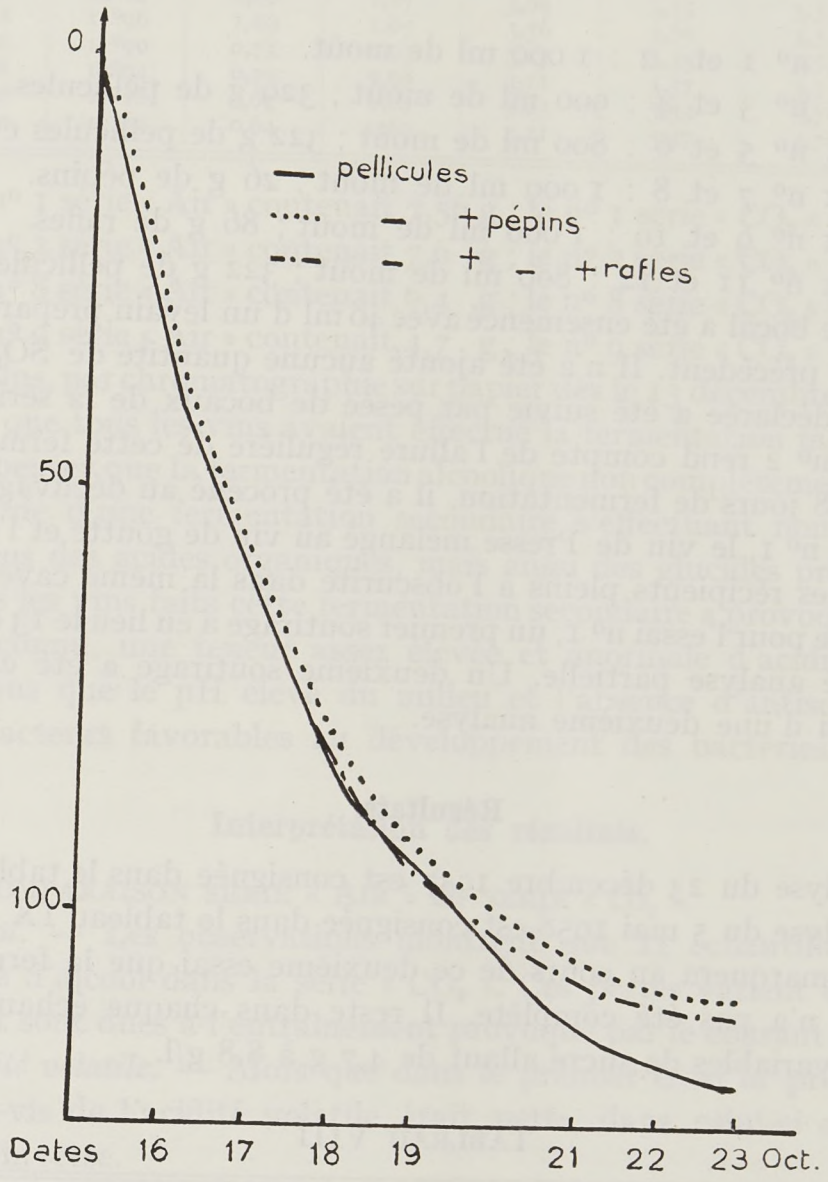
Variations du pH en fonction des éléments solides de la vendange

Série	N°	Analyse du 13.12.1957 pH	Analyse du 2.5.1958 pH
Air	2	3,42	3,35
	7	3,48	3,40
	10	3,60	3,50
Co_2	2	3,41	3,32
	7	3,50	3,38
	10	3,62	3,55
Air	2	3,42	3,35
	3	3,65	3,58
	5	3,70	3,60
	12	3,75	3,68
Co_2	2	3,41	3,32
	3	3,68	3,60
	5	3,67	3,60
	12	3,75	3,70

B. — ESSAI DU 15 OCTOBRE

Le poids de la vendange mis en œuvre a été de 46,5 kg. L'éraflage à la main a donné 44,1 kg de raisins égrappés et 2,4 kg de rafles.

Les 44,1 kg de raisins ont donné 27,8 litres de moût de densité 1096,3 et un gâteau formé par les parties solides, pesant 11,4 kg.



Courbes de fermentation N° 2.

1,9 kg de gâteau a été trié à la main. Il a donné 1,682 kg de pellicules et 0,119 kg de pépins.

Au cours de ces opérations d'éraflage, pressurage et épépinage, les pertes de matières dues aux manipulations sont rassemblées dans le tableau VII.

TABLEAU VII

	Poids avant	Poids après	Pertes	P. 100
Egrappage	46,5	46,4	0,1	0,21
Pressurage	44,1	41,882	2,218	5,02
Epépinage.....	1,9	1,801	0,099	5,21

Dans chaque série les parties constitutives de la vendange ont été réparties dans 12 bocaux numérotés de 1 à 12 selon les proportions suivantes :

Bocaux n° 1 et 2 : 1 000 ml de moût.

Bocaux n° 3 et 4 : 900 ml de moût ; 329 g de pellicules.

Bocaux n° 5 et 6 : 800 ml de moût ; 322 g de pellicules et pépins.

Bocaux n° 7 et 8 : 1 000 ml de moût ; 26 g de pépins.

Bocaux n° 9 et 10 : 1 000 ml de moût ; 86 g de rafles.

Bocaux n° 11 et 12 : 800 ml de moût ; 322 g de pellicules.

Chaque bocal a été ensemencé avec 40 ml d'un levain préparé comme dans l'essai précédent. Il n'a été ajouté aucune quantité de SO_2. La fermentation déclarée a été suivie par pesée de bocaux de la série « air ». La courbe n° 2 rend compte de l'allure régulière de cette fermentation.

Après 8 jours de fermentation, il a été procédé au décuvage comme dans l'essai n° 1, le vin de Presse mélangé au vin de goutte et l'ensemble mis dans des récipients pleins à l'obscurité dans la même cave.

Comme pour l'essai n° 1, un premier soutirage a eu lieu le 13 décembre suivi d'une analyse partielle. Un deuxième soutirage a été effectué le 2 mai suivi d'une deuxième analyse.

Résultats.

L'analyse du 23 décembre 1957 est consignée dans le tableau VIII.

L'analyse du 5 mai 1958 est consignée dans le tableau IX.

On remarquera au cours de ce deuxième essai que la fermentation alcoolique n'a pas été complète. Il reste dans chaque échantillon des quantités variables de sucre allant de 4,7 g à 8,8 g/l.

TABLEAU VIII

N°	Acidité volatile		Acidité fixe		pH	
	Air	Co_2	Air	Co_2	Air	Co_2
2	0,95	0,98	3,95	4,02	3,60	3,62
3	0,83	0,85	4,07	4,25	3,70	3,70
5	0,80	0,91	4,30	3,89	3,70	3,70
7	1,12	1,22	3,98	4,08	3,55	3,57
9	0,75	0,95	3,75	3,70	3,72	3,75
11	0,68	0,71	3,72	3,69	3,77	3,80

TABLEAU IX

N°	Degrés		Acidité Volatile		Acidité Fixe		PH	
	Air	CO_2	Air	CO_2	Air	CO_2	Air	CO_2
1	12°86	12°38	0,83	1,18	3,67	3,42	3,5	3,5
2	12°62	12°56	0,90	0,91	3,70	3,69	3,5	3,5
3	13°08	13°00	0,79	0,77	3,71	3,43	3,6	3,65
4	13°02	12°09	0,84	0,83	3,81	3,42	3,6	3,65
5	12°74	12°26	0,75	0,82	3,65	3,53	3,6	3,6
6	12°80	12°46	0,75	0,85	3,65	3,55	3,6	3,6
7	12°98	12°02	0,86	1,07	3,64	3,73	3,5	3,5
8	12°48	11°96	1,09	1,05	3,56	3,70	3,5	3,5
9	12°56	11°90	0,73	0,95	3,27	3,35	3,7	3,65
10	12°68	11°94	0,79	0,98	3,11	3,37	3,7	3,65
11	12°56	12°18	0,67	0,67	3,23	3,33	3,7	3,72
12	12°60	12°62	0,64	0,63	3,21	3,37	3,72	3,72

Ainsi le n° 1 série « Air » contenait 7,56 g ; le n° 1 série « CO_2 « 6,24 g/l.
le n° 2 série « Air » contenait 7,6 g ; le n° 2 série « CO_2 « 5,97 g/l.
le n° 8 série « Air » contenait 6,4 g ; le n° 8 série « CO_2 « 8,8 g/l.
le n° 9 série « Air » contenait 4,7 g ; le n° 9 série « CO_2 « 5,22 g/l.

De plus, par chromatographie sur papier dès le 13 décembre on pouvait observer que tous les vins avaient effectué la fermentation malolactique. On peut penser que la fermentation alcoolique non complètement terminée a été suivie d'une fermentation secondaire s'effectuant non seulement aux dépens des acides organiques, mais aussi des glucides présents.

Dans les vins faits cette fermentation secondaire a provoqué, comme cela est connu, une teneur assez élevée et anormale d'acidité volatile.

Notons que le pH élevé du milieu et l'absence d'antiseptique ont été des facteurs favorables au développement des bactéries.

Interprétation des résultats.

1° COMPARAISON SERIE « AIR » ET SERIE « CO_2 ».

Alcool. — Les observations montrent que 11 échantillons sur 12 ont moins d'alcool dans la série « CO_2 ». Ces pertes varient entre 0,60° et 0,96° et sont dues à l'entraînement provoqué par le courant de « CO_2 ».

Acidité volatile. — Alors que dans le premier essai la protection de CO_2 vis-à-vis de l'acidité volatile était nette, dans celui-ci on observe presque l'inverse.

Sept échantillons sur douze accusent une acidité plus élevée dans la série « CO_2 « que dans la série « Air » ; les cinq autres offrent une valeur très peu différente entre les deux séries, de l'ordre de grandeur de la précision des analyses.

Une partie de l'acidité volatile provenant, comme il a été dit, d'une fermentation secondaire des glucides on peut être amené à penser que l'état d'anaérobiose du au courant de CO_2, ou la teneur plus élevée du CO_2 lui-

même peuvent être des facteurs favorisant cette fermentation secondaire.

Acidité fixe. — Dans le premier essai l'acidité fixe était plus faible dans tous les échantillons de la série « CO_2 ». Ici six échantillons sont plus faibles et six plus élevés. Comme l'acide lactique qui intervient dans l'acidité fixe peut provenir dans le cas présent soit de la décomposition des acides organiques, soit des sucres, les variations observées pourraient provenir d'une fermentation secondaire plus ou moins poussée aux dépens de ces derniers. Il est donc difficile d'interpréter sans une analyse plus complète.

2° Comparaison en fonction des differents elements solides de la vendange.

Alcool. — Le tableau IV donne pour l'essai n° II la variation du degré alcoolique en fonction des éléments solides de la vendange. La diminution du degré alcoolique d'une vinification avec rafle est encore une fois confirmée.

pH. — L'augmentation de la valeur du pH des échantillons vinifiés avec rafles est aussi confirmée comme dans le premier essai.

IV. — LES MATIÈRES TANNOIDES

Les matières tannoides ont principalement été dosées jusqu'à présent dans les vins par des méthodes chimiques.

Récemment P. Ribereau-Gayon (3) a proposé un dosage spectrophotométrique dans les vins, Owades, Rubin et Brenner (6) dosent le tanin dans le thé et dans la bière en se basant sur les propriétés de ces derniers d'absorber dans l'U. V. à 2 750 A°.

Nous avons avec un secptrophotomètre Jobin et Yvon établi les courbes d'absorption dans l'U. V. et le visible des vins de nos essais, à des dilutions variables dans l'alcool à 15°.

1° Courbe d'absorption dans l'ultra-violet.

Cette courbe nous montre pour tous les vins un minimum à 2 600 A° et un maximum à 2 750-2 800 A°. Ce maximum à 2 750 se retrouve dans un certain nombre de composés polyphénoliques en particulier dans les tanins catéchiques et aussi dans les composés de même structure comme les antocyanidols.

La courbe d'absorption enregistre une élévation de la densité optique à 2 750-2 800 A° en rapport avec la qualité des parties solides de la vendange. Dans les vins vinifiés en rosé comme en rouge c'est avec une macération des rafles que l'augmentaton de la densité optique est maximum. Fait curieux pour les vins rouges : l'essai avec les pellicules et les pépins a une densité optique plus faible que l'essai avec les pellicules seules.

D'autres essais diront si ce phénomène est général. Quoiqu'il en soit, la mesure de la densité optique d'un vin dilué, vers 2 750 A° permet de se faire une idée de sa teneur en substances polyphénoliques.

Les figures n° 1 et n° 2 donnent les courbes d'absorption dans l'ultra-violet pour les vins rouges et les vins rosés. On voit que les différences apportées par les différents éléments solides de la vendange : pépins, rafles et pellicules, se répercutent sur l'allure de la courbe d'absorption.

Pour chacun des échantillons on a effectué :

a) Le *dosage des tanins* selon la méthode NEGRE (4). Les résultats sont rassemblés dans le tableau X sous forme d'indice de permanganate.

b) La mesure de l'absorption à 2 750 A° à la dilution de 1/20 pour les vins rosés, et de 1/30 pour les vins rouges. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XI.

TABLEAU X

(Valeurs exprimées en ml de MnO_4K pour 10 ml de vin).

Moyenne des échantillons	Tanins totaux		Œnotanins	
	Air	CO_2	Air	CO_2
Rouge				
N° 3 et 4 pellicule seule	2,47	2,65	0,7	0,72
N° 5 et 6 vendange égrappée	2,57	2,92	0,82	0,90
N° 11 et 12 vendange entière	3,52	4,95	0,90	1,95
Rosé				
N° 1 et 2	0,15	0,80	0,05	0,05
N° 8 et 7 pépins	0,62	0,92	0,15	0,32
N° 9 et 10 rafles	1,45	2,20	0,5	0,9

TABLEAU XI

Moyenne des échantillons	Valeur de $\log \frac{I^o}{I}$				Valeurs exprimées en mg par litre de tanin de rafles			
	Air	CO_2	Δ	%	Air	CO_2	Δ	%
Rouge								
N° 3 et 4 pellicule seule	1,060	1,070	+ 0,010	0,94	1 632	1 644	+ 12	0,73
N° 5 et 6 vendange égrappée	0,985	1,050	+ 0,065	6,59	1 476	1 620	+ 144	9,75
N° 11 et 12 vendange entière	1,195	1,315	+ 0,120	10,04	1 800	1 998	+ 198	11,00
Rosé								
N° 1 et 2	0,445	0,510	+ 0,065	14,6	460	520	+ 60	130
N° 7 et 8 pépins	0,494	0,605	+ 0,111	22,46	500	620	+ 120	24
N° 9 et 10 rafles	0,737	0,957	+ 0,220	29,85	744	980	+ 236	31,7

Dans ce tableau nous avons indiqué en mg par litre de vin, la quantité de tanins extraits des rafles à laquelle correspondrait la densité optique observée compte tenu de la dilution.

L'extraction à l'éther des tanins d'une solution alcoolique des rafles provenant des raisins du même essai, a permis de préparer une poudre de tanins. On a dressé la courbe de correspondance entre la densité optique à 2 750 A° et les quantités de tanins ainsi obtenues.

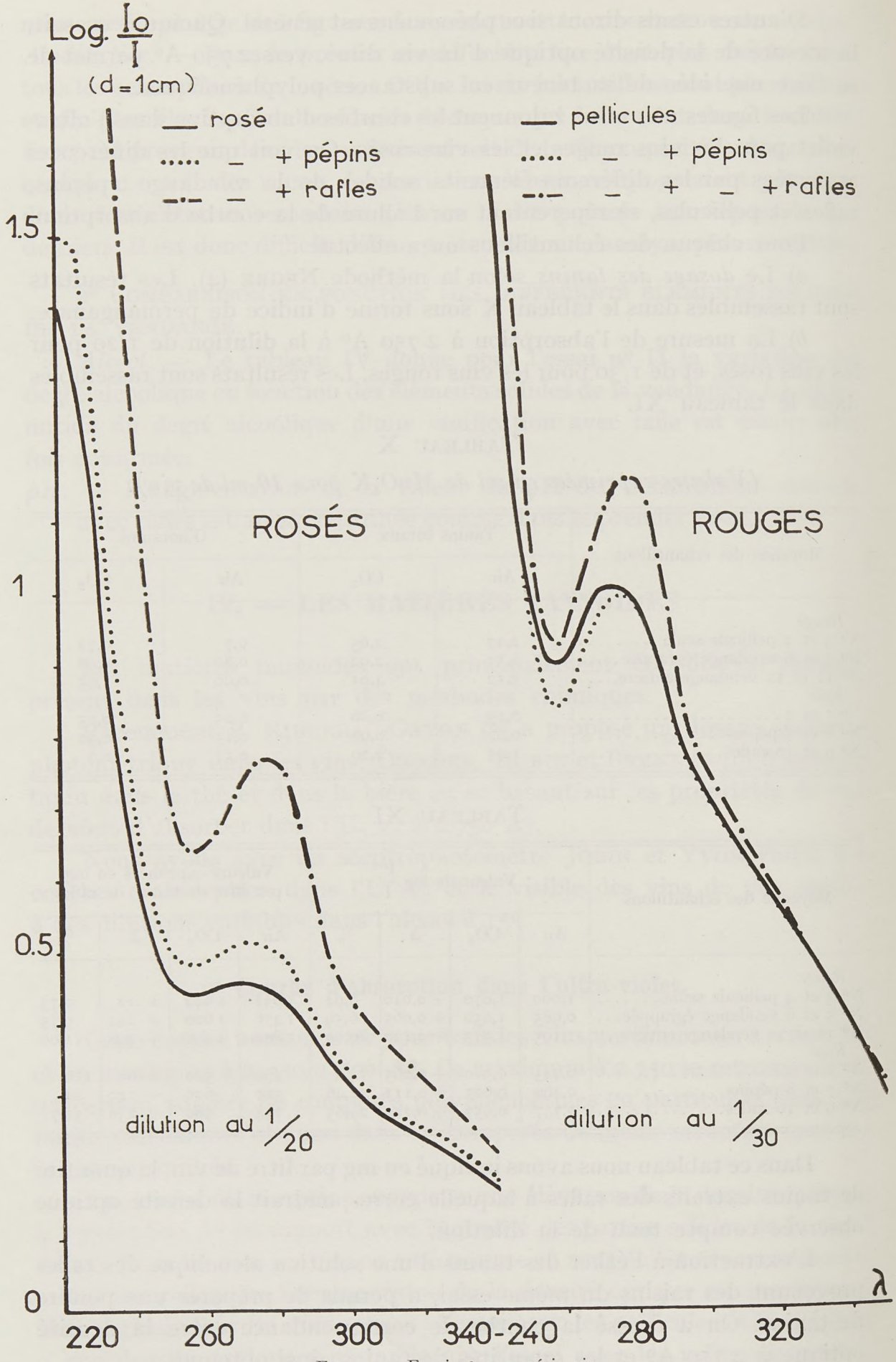


FIG. 1. — Essai n° 1 — série air.

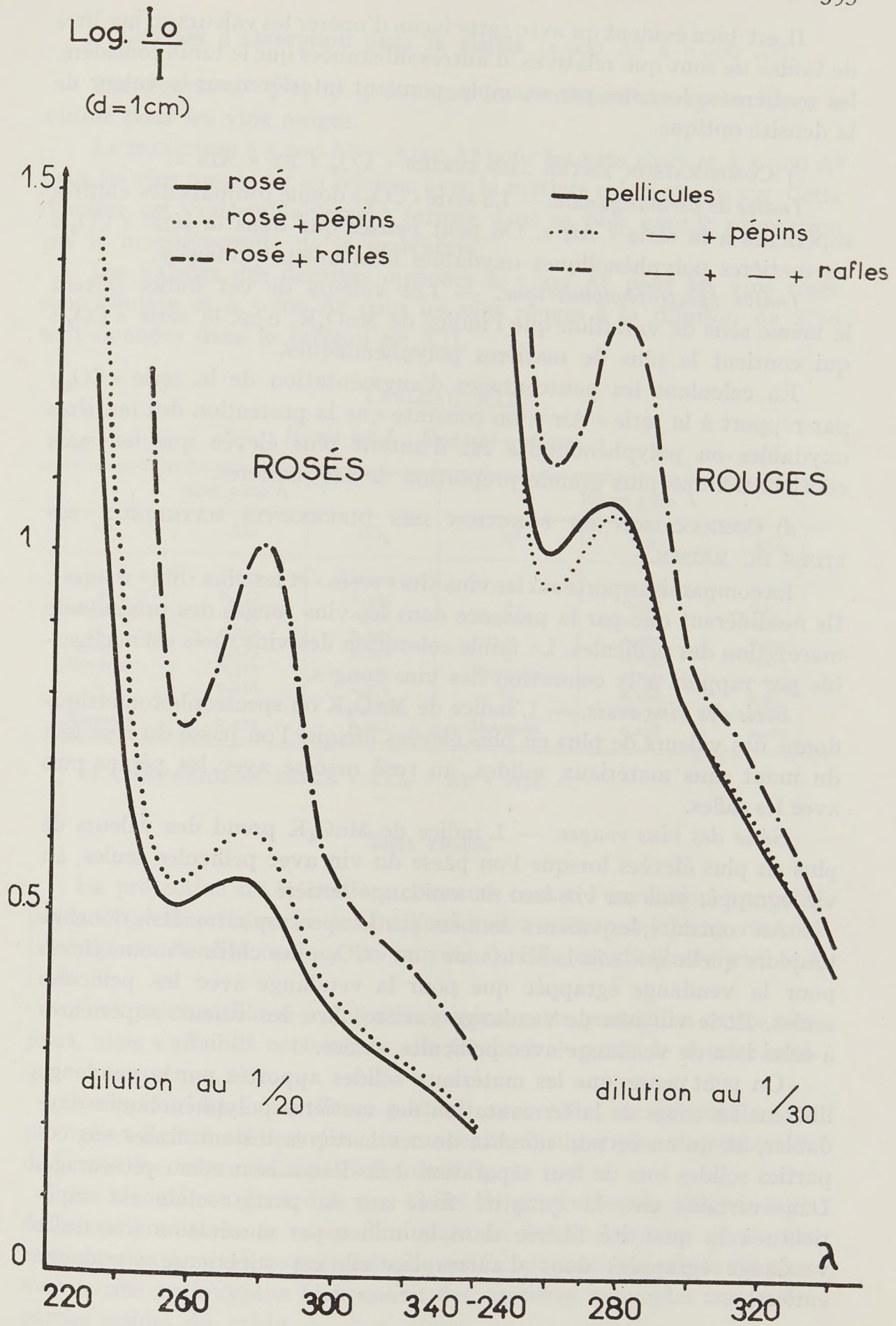


FIG. 2. — Essai n° 1 — série CO_2.

Il est bien évident qu'avec cette façon d'opérer les valeurs en mg/litre de tanins ne sont que relatives, d'autres substances que le tanin considéré, les matières colorantes par exemple, pouvant interférer sur la valeur de la densité optique.

c) Comparaison entre les series « CO_2 » et « Air ».

Indice de permanganate. — La série « CO_2 » donne toujours des chiffres supérieurs à la série « Air ». On peut penser que dans la série « CO_2 » les matières polyphénoliques oxydables sont mieux protégées.

Indice spectrophotométrique. — Les valeurs de cet indice offrent le même sens de variation que l'indice de MnO_4K, c'est la série « CO_2 » qui contient le plus de matières polyphénoliques.

En calculant les pourcentages d'augmentation de la série « CO_2 » par rapport à la série « Air », on constate que la protection des matières oxydables ou polyphénoliques est d'autant plus élevée que les essais contiennent une plus grande proportion de ces matières.

d) Comparaison en fonction des differents materiaux solides du raisin.

La comparaison porte sur les vins dits « rosés » et les vins dits « rouges ». Ils ne diffèrent que par la présence dans les vins rouges des produits de macération des pellicules. La faible coloration des vins rosés est négligeable par rapport à la coloration des vins rouges.

Série des vins rosés. — L'indice de MnO_4K ou spectrophotométrique donne des valeurs de plus en plus élevées lorsque l'on passe du rosé issu du mout sans matériaux solides, au rosé macéré avec les pépins puis avec les rafles.

Série des vins rouges. — L'indice de MnO_4K prend des valeurs de plus en plus élevées lorsque l'on passe du vin avec pellicules seules, au vin égrappé, puis au vin issu de vendange entière.

Au contraire, les valeurs données par la spectrophotométrie donnent toujours quelle que soit la série « air » ou « CO_2 » des chiffres moins élevés pour la vendange égrappée que pour la vendange avec les pellicules seules. Et le vin issu de vendange entière offre des valeurs supérieures à celui issu de vendange avec pellicules seules.

On peut penser que les matériaux solides apportés par la vendange libèrent au cours de la fermentation des matières polyphénoliques oxydables, et qu'un certain nombre de ces matières restent fixées sur ces parties solides lors de leur séparation à la décuvaison et au pressurage. Dans certains cas, la quantité fixée sur la partie solide est supérieure à la quantité libérée dans le milieu par macération (cas de la vendange égrappée) dans d'autres cas elle est supérieure (vendange entière).

2° **Courbes d'absorption dans le visible** (4 000 A° à 6 000 A°).

Les figures n° 3 et n° 4 donnent les courbes d'absorption dans le visible pour les vins rouges.

Le maximum à 5 200 A° — 5250 A° pour les vins rosés et à 5 300 A° pour les vins rouges est en relation avec la matière colorante du vin. Cette dernière est vraisemblablement formée dans sa plus grande proportion par le monoglucoside de la malvidine.

Les valeurs des densités optiques à 5 200 A° pour les vins rosés sans dilution et à 5 300 A° pour les vins rouges à la dilution de 1/10 sont données dans le tableau n° XII.

TABLEAU XII

Essai n° 1 : Densité optique.

Rosé 5 200 Å			Rouge 5 300 Å		
N°	Air	CO_2	N°	Air	CO_2
1	0,250	0,420	3	0,357	0,300
2	0,235	0,325	4	0,325	0,272
Moyenne	0,242	0,372	Moyenne	0,341	0,286
7	0,330	0,345	5	0,300	0,290
8	0,325	0,342	6	0,298	0,305
Moyenne	0,327	0,343	Moyenne	0,299	0,297
9	0,418	0,372	11	0,284	0,281
10	0,410	0,435	12	0,272	0,286
Moyenne	0,414	0,403	Moyenne	0,278	0,283

a) COMPARAISON SERIE « CO_2 » ET « AIR ».

Vins rosés.

La protection de la matière colorante contre l'oxydation, apportée par le CO_2, est nette sur les échantillons 1 et 2 correspondant au vin rosé (+ 0,130 de densité optique en moyenne). Elle est d'ailleurs visible à l'œil.

Sur les échantillons 7 et 8 avec pépins, cette protection existe toujours, mais s'affaiblit nettement ; elle tombe à + 0,016 de densité optique en moyenne.

Enfin, sur les échantillons 9 et 10 avec rafle, un échantillon est protégé et l'autre ne l'est pas. En moyenne, il n'y a plus de protection de la matière colorante sous l'effet du CO_2.

En résumé, on peut dire que l'effet de protection du CO_2 vis-à-vis de la matière colorante va en diminuant au fur et à mesure que le vin contient plus de matières polyphénoliques. Ce fait peut-être mis en relation avec le rôle antioxygène bien connu des matières tannoïdes issues des parties solides du raisin.

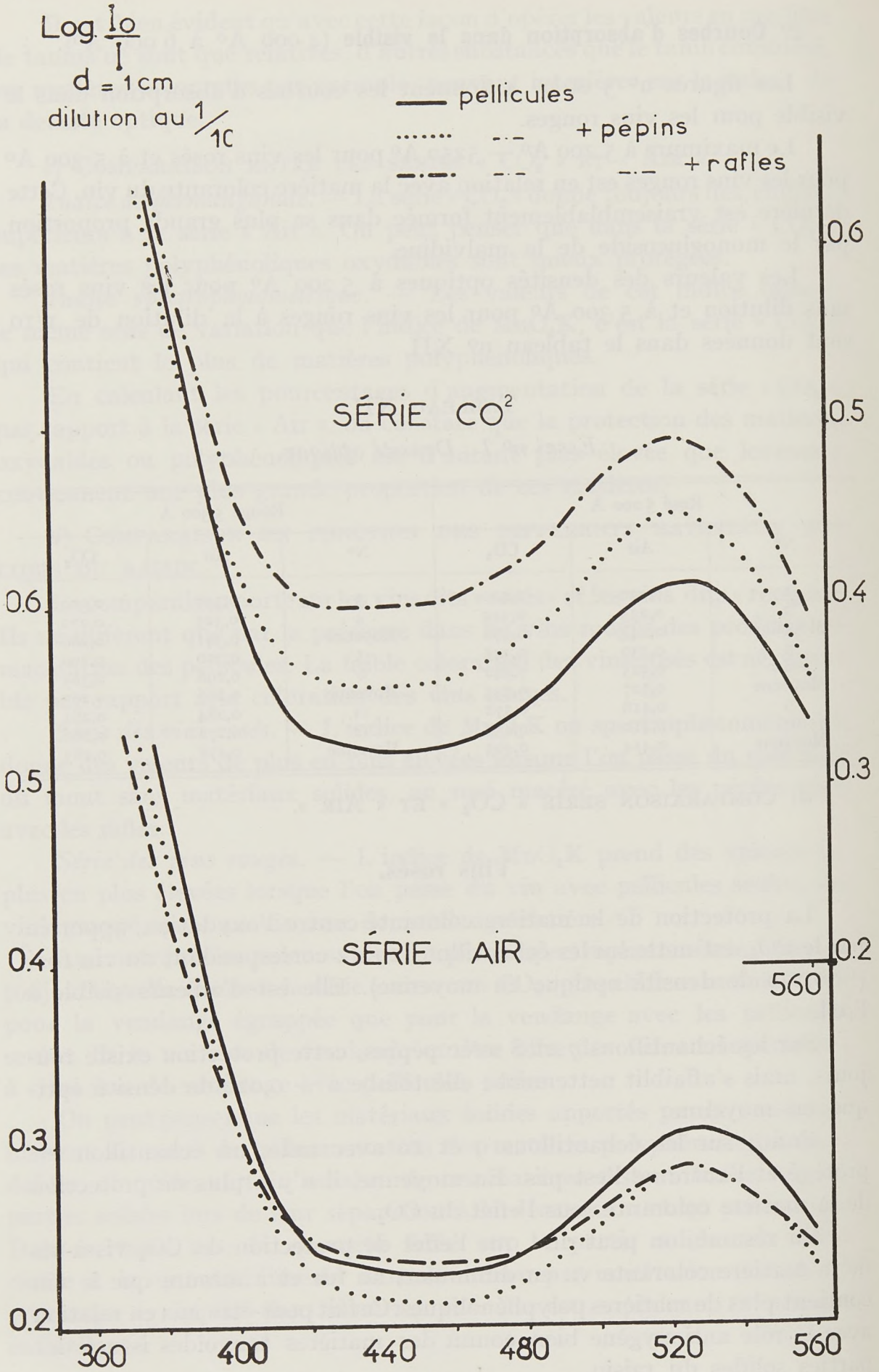


FIG. 3 et 4. — Essai n° 1 — rouges.

Vins rouges.

Les vins rouges de cet essai diffèrent des vins rosés précédents uniquement par le fait que durant la fermentation il y a eu macération des pellicules qui apportent la matière colorante ; globalement c'est la teneur beaucoup plus élevée en matière colorante dans les vins rouges qui est le caractère principal puisque les autres facteurs sont pratiquement restés constants. Or, ce qui est remarquable et paradoxal c'est que l'action de protection du CO_2 vis-à-vis de la matière colorante des vins rouges est pratiquement inversée par rapport à ce qu'elle était pour les vins rosés. En effet, ici lorsque la matière colorante est seule — échantillons 3 et 4 (pellicules seules), il n'y a pas d'effet de protection du CO_2, c'est même l'inverse qui se produit puisque les vins de la série « air » sont plus colorés que ceux de la série «CO_2 ». Avec l'apport des pépins on peut dire que la couleur n'est pratiquement pas influencée par le CO_2. Avec la vendange entière (pépins + rafles + pellicules) la protection de la couleur positive dans un cas, négative dans l'autre, est aussi très faible quoique plus élevée que dans le cas de la vendange avec pépins (égrappée).

L'effet de la protection du CO_2 vis-à-vis de la matière colorante ne serait donc pas le même si le vin contient peu ou beaucoup de matière colorante. Cette observation mérite d'être complétée pour s'assurer de sa généralisation et de sa variabilité.

b) Comparaison en fonction des differents materiaux solides du raisin.

Vins rosés.

La couleur fonce lorsque l'on passe du rosé pur au rosé avec pépins et au rosé avec rafles dans la série « air ». Dans la série CO_2 le rosé avec pépins a une couleur plus faible que le rosé normal, mais le rosé avec rafles reprend une valeur supérieure.

Vins rouges.

A l'inverse des rosés, les rouges de la série « Air » ont une densité optique qui diminue lorsque l'on passe des pellicules seules à la vendange égrappée, puis à la vendange entière, la couleur semble diminuer. Il est vraisemblable qu'une partie de la matière colorante reste fixée sur les parties solides après le pressurage. Ce phénomène avait été noté en 1935 (5).

Pour la série « CO_2 » ce phénomène passe inaperçu.

Ces différentes observations sont résumées dans le tableau XIII :

TABLEAU XIII

N° Moyenne	Densité Optique	
	Air	CO_2
Roses.		
1–2	0,242	0,372
7–8	0,327	0,343
9–10	0,414	0,403
Rouges.		
3–4	0,341	0,286
5–6	0,299	0,297
11–12	0,278	0,283

3°) **Observations sur le deuxième essai.**

Pour le deuxième essai, le dosage des tanins selon la méthode NEGRE est donné dans le tableau XIV. Les mesures d'absorption à 2 750 A° dans le tableau XV. (Ces mesures sont effectuées à la dilution de 1/20 pour les rosés et de 1/30 pour les rouges dans l'alcool à 15 p. 100.

TABLEAU XIV

Essai n° 11 — Indice de permanganate
(Méthode Négre — en ml de MnO_4K *pour 10 ml de vin).*

Moyenne des échantillons	Tanins totaux		
	Air	CO_2	
Rouge.			
N°3 et 4 pellicule seule	3,3	2,8	— 0,5
N°5 et 6 vendange égrappée	2,65	4,05	+ 1,4
N°11 et 12 vendange entière	4,3	4,85	+ 0,55
Roses.			
N° 1 et 2	0,95	1,15	+ 0,2
N°7 et 8 (pépins)	1,10	0,45	— 0,65
N°9 et 10 (rafles)	2,65	2,92	+ 0,27

TABLEAU XV

Moyenne des échantillons	Valeur de $\log \frac{I^0}{I}$			Valeurs exprimées en mg par litre de tanins de rafles		
	Air	CO_2		Air	CO_2	
Rouge						
N° 3 et 4 pellicule seule	1,056	1,111	+ 0,055	1 620	1 692	+ 72
N° 5 et 6 vendange égrappée	1,100	1,145	+ 0,045	1 680	1 746	+ 66
N° 11 et 12 vendange entière	1,330	1,430	+ 0,100	1 940	2 910	+ 250
Rosé						
N° 1 et 2	0,521	0,545	+ 0,024	528	556	+ 28
N° 7 et 8 (pépins)	0,552	0,594	+ 0,042	560	604	+ 44
N° 9 et 10 (rafles)	1,035	1,100	+ 0,065	1 048	1 120	+ 72

a) Comparaison serie « air » et serie « CO_2 ».

L'indice de permanganate offre des valeurs variables. L'indice spectrophotométrique offre des valeurs toujours plus élevées pour la série « CO_2 ». La protection des matières polyphénoliques étant d'autant plus élevée que les vins contiennent plus de ces matières, comme au cours du premier essai.

b) Comparaison en fonction des differents materiaux solides du raisin.

L'accord dans le sens de la variation constaté au cours des premiers essais entre l'indice de permanganate et l'indice spectrophotométrique, est moins net au cours de ce deuxième essai.

Toutefois, l'indice spectrophotométrique donne régulièrement des valeurs plus élevées lorsque l'on passe des essais sans pépins ni rafles à ceux avec pépins seuls, puis à la vendange entière.

Le fait signalé au cours du premier essai, à savoir, que l'échantillon avec pellicules seules présentait une valeur plus élevée que celui avec pellicules + pépins ne se retrouve pas ici. D'autres essais devront être entrepris pour se rendre compte ou de la variabilité de l'échantillonnage, ou de l'influence de l'état de maturité des pépins.

c) Mesures d'absorption dans le visible.

Ces mesures effectuées selon les dilutions signalées au cours du premier essai sont rassemblées dans le tableau XVI.

Tableau XVI

Rosé 5 200 Å			Rouge 5 300 Å		
N°	Air	CO_2	N°	Air	CO_2
1	0,580	0,642	3	0,365	0,350
2	0,591	0,585	4	0,321	0,411
Moyenne	0,585	0,613	Moyenne	0,343	0,380
7	0,560	0,609	5	0,321	0,360
8	0,600	0,542	6	0,326	0,321
Moyenne	0,580	0,575	Moyenne	0,323	0,340
9	0,695	0,725	11	0,296	0,360
10	0,715	0,731	12	0,317	0,332
Moyenne	0,705	0,728	Moyenne	0,306	0,346

L'effet de protection du CO_2 sur la matière colorante est ici peu net sur les rosés.

La perte de couleur chez les rouges, lorsque l'on passe des pellicules seules (vendange égrappée), à la vendange entière, se retrouve comme dans l'essai précédent.

V. — CONCLUSIONS

Elles concernent d'abord la technique de microvinification, ensuite l'influence des constituants solides du raisin.

Les différences constatées en microvinification entre la série « air » et la série « CO_2 » sont assez significatives. L'état d'aération des raisins ou plus explicitement la différence de diffusion de l'oxygène avant et au cours de la fermentation alcoolique dans les récipients de très faible capacité a une influence marquée sur la composition finale du vin obtenu.

Ceci est extrêmement important, et pose tout le problème de la préfermentation, en phase anaerobie des raisins problème qui jusqu'à présent n'avait pas préoccupé la grande majorité des œnologues.

La méthode expérimentée sous courant de CO_2 semble donner des résultats qui, plus que ceux de la méthode courante (série « air » dans nos essais) se rapproche le plus des résultats obtenus en grande pratique. En outre, et ceci est fondamental, la série « CO_2 » offre une régularité que ne présente pas la série ordinaire.

Certes, la série CO_2 est marquée par une perte d'alcool. Mais celle-ci peut facilement être évitée. Le principe de la technique ne doit pas être mis en cause.

Cet ensemble de faits indiquerait déjà que la microvinification sous courant de CO_2 peut donner des résultats valables pour la grande pratique œnologique. C'est pourquoi nos travaux ultérieurs s'orienteront vers l'amélioration de cette technique, la technique ordinaire devant être abandonnée.

Certains pourraient préconiser un gaz inerte, comme l'azote. On s'éloignerait ainsi des conditions de la pratique — puisque les cuves de fermentation sont saturées de CO_2 dès le départ de la fermentation alcoolique.

L'influence des divers constituants solides du raisin est marquée par des résultats qui confirment en général, nos connaissances actuelles. Soulignons toutefois l'effet bénéfique des pépins — rarement signalé —, l'action salifiante des pellicules et des rafles. Et mettons en relief le double phénomène de dissolution des matières tannoïdes et d'absorption ou de précipitation d'une partie d'entre elles par la pellicule elle-même et la rafle — double phénomène qui n'avait pas encore été signalé.

L'examen spectrophotométrique a permis de constater une absorption minimum à 2,600 A° et un maximum à 2 750-2 800 A° caractérisant ainsi des tanins catéchiques ou des composés de même structure comme les antocyanidols.

En tout on relève une élévation de la densité optique avec les matériaux solides du raisin — surtout avec la rafle.

La comparaison entre la densité optique à 2 750 A° et la quantité de tanins extraits à l'éther a permis d'établir une relation comparative. L'interférence probable des matières colorantes ne permet pas d'en déduire une méthode de dosage satisfaisant. Mais le problème est à l'étude.

Reçu pour publication le 25 juillet 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Le Problème de l'extraction des Jus en relation avec les Procédés de Vinification propres à chaque région viticole. Colloque de Mâcon, 19 et 20 mai 1958.

(2) CHEFTEL (R.-I.), MUNIER (R.) et MACHEBŒUF (M.). — Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydrosolubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33,** p. 840-845, 1951.

(3) RIBEREAU-GAYON (P.). — Le Leucocyanidol dans les Vins Rouges. *C. R. Ac. Agr. Fr.*, **43,** p. 821-823, 1957.

(4) NÈGRE (E.). — Contribution à l'étude des matières tannoïdes du Vin. Thèse, Montpellier 1945.

(5) FLANZY (M.). — Sur une cause d'arrêt de la fermentation alcoolique dans la vinification en rouge. Nouvelles règles de vinification et d'égrappage. *Rev. Vit.*, **84,** 217, 1935.

(6) OWADES (J.), RUBIN (G.) et BRENNER (M.). — Determination of Food Tannins by Ultraviolet spectrophotometry. *Journal of Agricul. and Food Chemistry.* Vol. 6, n° 1, p. 44-46, 1958.

SUR LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE QUELQUES VINS

PAR

P. BIDAN et Lucette ANDRÉ

Station de Technologie végétale, Versailles.

PLAN DU MÉMOIRE

I. — Introduction.

II. — Travaux antérieurs.

III. — Travaux personnels.

a) méthodes employées ;
b) résultats obtenus :
— les acides aminés trouvés ;
— comparaison avec les données bibliographiques ;
— influence de l'hydrolyse ;
— comparaison des vins entre eux.

IV. — Conclusion.

I. — INTRODUCTION

L'étude des problèmes posés par la préparation des vins jaunes du Jura, vins du type Xérès, nous a d'abord conduits à étudier la flore de ces vins, en particulier les levures à voile, germes essentiels à l'élaboration de ces vins. Ces levures (*Saccharomyces oviformis, Saccharomyces bisporus*) produisent dans les vins jaunes, de fortes doses d'aldéhydes (de l'ordre de 120 à 1 000 mg/l). Ces aldéhydes sont avec l'acétyl-méthyl-carbinol, corps que l'on trouve en quantité très importante dans ce type de vin, l'un des produits qui différencient les vins jaunes des autres vins. Cependant, si la présence de ces corps explique le bouquet spécial de ces vins, elle n'explique pas seule leur originalité. En particulier, leur goût présente une certaine amertume qui nous avait semblé pouvoir provenir de l'autolyse des levures : en effet, d'une part ces vins restent en vidange sur leurs lies pendant au moins six ans et sous voile pendant quatre ou cinq ans, d'autre part, d'après l'expérience des praticiens, ces vins « mangent leur lie », c'est-à-dire que la quantité de lie que l'on trouve à la mise en bouteille, est très faible (environ 1 litre à 1,5 litre

pour 400 à 600 litres de vin). Il nous a semblé intéressant de comparer la composition en acides aminés de ces vins avec celle d'autres vins blancs vinifiés par des procédés plus classiques. Comme la quantité globale d'acides aminés de ces vins, ne nous a montré aucune différence avec les chiffres donnés pour d'autres vins (tableau I), nous nous sommes orientés vers le dosage qualitatif et quantitatif des acides aminés, ce que nous avons pu réaliser en utilisant les méthodes de chromatographie sur papier.

TABLEAU I

Teneur en N, en NH_4 et en N aminé de quelques vins.

Origine	Bibliographie	Nombre d'échantillons	N total en méq./l.			N ammoniacal en méq./l.			N aminé en méq./l.		
			Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.	Min.	Moy.	Max.
Vin jaune	auteur	15	17,4	26,5	34,6	1,93	3,7	10,3	4,4	7,5	12
Xérès	Bobadilla et Navarro (39)	25	7,9	16,4	22,7	0,2	1,1	2,5			
Vin blanc	Muth et Malsch (40) d'après Amerine (41)	4	21,5	33,6	47,5	1	2,1	3,2	8,6	13,1	15,9
Vin rouge	Ribereau-Gayon et Peynaud (42)	35	10,2	23,6	47,5	0,7	1,28	5,05	2,9	5,7	9,35
Vin blanc	Ribereau-Gayon et Peynaud (42)	36	5,5	13,2	27	0	0,35	1	0,7	2,4	4,8
Vin blanc	Hennig (43) d'après Amerine (41)	19	22,4	35,1	52,5	0,2	0,4	1,6	4,8	7,7	14

II. — TRAVAUX ANTÉRIEURS

1° TRAVAUX PAR AUTEURS ET PAR ORDRE CHRONOLOGIQUE.

Les travaux concernant l'étude des acides aminés des vins sont tous assez récents mais déjà nombreux.

Les premiers chercheurs utilisaient surtout les méthodes microbiologiques, qui ne permettent que l'étude successive des acides aminés, mais les résultats vraiment quantitatifs obtenus jusqu'à ce jour leur sont dûs ; les résultats obtenus par chromatographie sur papier ne peuvent être considérés que comme semi-quantitatifs. Aucun résultat concernant le dosage des acides aminés des vins par chromatographie sur colonne n'a, à notre connaissance, paru dans la littérature.

Par contre la chromatographie sur papier permet une étude tellement plus rapide, qu'elle a été choisie par le plus grand nombre de chercheurs.

Il conviendrait de donner un tableau récapitulatif des résultats obtenus jusqu'ici, mais cela est difficile, l'amélioration des techniques

augmentant sans cesse le nombre des acides aminés reconnus ; de plus, les auteurs n'indiquent pas toujours le volume de vin ou de moût sur lequel ils opèrent ; et ils donnent, en général, une estimation simplement visuelle. De plus, ils ont travaillé sur des vins d'âges très différents, ce qui est peut-être le principal facteur de variabilité, et ont utilisé différentes méthodes de purification des solutions.

S'ils s'accordent le plus souvent pour admettre la présence, compte tenu des différences de matières premières, de la plupart des acides aminés réagissant fortement à la ninhydrine, ils ont aussi considéré comme présents seulement à l'état de traces, ceux dont la réactivité à la ninhydrine est la plus faible.

Il convient donc d'étudier successivement leurs travaux.

Les auteurs russes SISSAKYAN et BEZINGER (1949-1950) (1, 2) sont les premiers à avoir abordé ce problème. Travaillant en chromatographie unidimensionnelle, et en utilisant comme solvant le phénol ammoniacal à 0,1 p. 100, saturé d'eau, ils ont signalé dans des vins de Géorgie : en assez forte quantité l'acide glutamique, l'alanine, la valine, et la proline ; en faible quantité, l'acide aspartique, la sérine et la thréonine ; à l'état de traces, la phénylalanine. Ils insistent sur la présence en quantité particulièrement importante de la proline, dont ils donnent une estimation quantitative en dosant successivement les acides aminés par leur fonction NH_2 (Van Slyke, NO_2H) et par leur fonction COOH (Van Slyke, méthode à la ninhydrine) ; la proline ne présentant pas de radical NH_2 libre, est obtenue par différence. Avec leurs collaborateurs, ils ont poursuivi leurs travaux pendant les années suivantes (SISSAKYAN, 1953 (3) ; SISSAKYAN et BEZINGER, 1953 (4), BÉRIDZÉ, BEZINGER, SIRBILADZE, et KUVALVA, 1953 (5).

Sur des vins de Géorgie, (variété Arcasitelli, des années 1949 et 1950) et à la suite d'une hydrolyse sulfurique destinée à scinder les peptides, ils ont déterminé les acides aminés suivants (par chromatographie à 2 dimensions phénol et collidine-α-piccoline) : acides aspartique et glutamique, sérine, thréonine, glycocolle, alanine, ac. γ amino-butyrique, valine, leucine, proline, et tryptophane par dosage microbiologique — soit 11 acides aminés.

Ils ont étudié la transformation des matières azotées du moût de raisin pendant et après la fermentation, et au cours du vieillissement. Ils constatent que pendant la fermentation, il y a une très forte diminution de la teneur en acides aminés, qu'ils soient exprimés sous forme de N-NH_2 ou de N-COOH. Dans certains cas, la proline même restait seule inutilisée par les levures, alors que les autres acides aminés disparaissaient dans la proportion de 90 à 100 p. 100. Les peptides diminuent également, hydrolysés par les peptidases de la levure. Puis les acides aminés réapparaissent progressivement, ainsi que les peptides, quand la fermentation

entre dans sa phase lente. La proline, en grande quantité à la fin de la période active de la fermentation, diminue au cours du vieillissement. Des tableaux donnés par SISSAKYAN et BEZINGER (1953) (4), on peut extraire les chiffres suivants :

	Nombre de jours	$N(NH_2)$ non hydrolysé mg/l.	N peptides mg./l.	N proline mg./l.
vin de 1949	0	190	—	—
	6	52,6	—	48,5
	66	88	45,3	30
	385	105	10,6	0
vin de 1950	0	181,8	—	—
	5	13,7	—	—
	76	68,7	51,3	38,0
	246	71,3	58,4	35,8

BÉRIDZÉ et coll. (5) indiquent pour différents vins de Géorgie les valeurs suivantes :

Variété	année		N mg./l.			
			total	animé	COOH	d'ou N sous forme de proline
Sitandali	1917	blanc	134	—	—	—
		rouge	374	—	—	—
Napareali.....	1925	blanc	165	—	—	—
		rouge	242	—	—	—
Mucusani	—	blanc	110,6	40,6	56,4	15,8
		rouge	208,3	71,8	112,2	40,4
Msvane.....	1949	blanc	122,8	43,1	65,5	22,4
Gurdjani	1949	blanc	105,8	32	52,5	20,5

En France, VALAIZE et DUPONT (6), en cherchant à établir un rapport entre le bouquet des vins et leur teneur en acides aminés, ont essayé dès 1951 de caractériser les acides aminés du moût. Dans 8 moûts de provenance variée, ils ont déterminé par chromatographie à 1 dimension dans le butanol : glycocolle, alanine, valine, leucine, proline et tyrosine. Ils signalent que le Sylvaner et le Traminer sont plus riches que les autres cépages.

DUPONT (7) a complété cette étude en 1953. Il a caractérisé, dans des moûts de Clairette et de Muscat de la Drôme, 11 acides aminés, à l'aide de la chromatographie à une ou deux dimensions.

Sont présents dans tous les échantillons : acides aspartique et glutamique, sérine, alanine, valine, proline, leucine ou isoleucine, phénylalanine et tyrosine. Dans certains seulement : thréonine et glycocolle, en faible quantité.

De plus, il a trouvé plusieurs polypeptides de composition non déterminée.

Une étude très complète a été entreprise en Suisse par LÜTHI et VETSCH en 1952-1953 (8,9). Ils ont entrepris leur travail dans le but de déterminer l'influence que peut avoir la composition du vin en acides aminés sur la fermentation malo-lactique. Ils ont utilisé la méthode de chromatographie à une dimension par l'emploi de multiples solvants, selon Mc FARREN (10). La purification était faite par passage sur un échangeur d'anions faiblement basique puis par ionophorèse.

Outre la nomenclature des acides aminés, ils ont essayé de déterminer la teneur au point de vue quantitatif, pour certains acides aminés, par comparaison visuelle avec des échelles d'acides aminés. Puis ils ont comparé entre eux, d'une part les vins provenant de différents moûts, mais de la même année, d'autre part, des vins provenant du même cépage, mais d'années différentes ; enfin, ils ont dosé les acides aminés d'un vin avant et après la fermentation malo-lactique.

Ils ont étudié un vin rouge, Clevner et trois sortes de vins blancs, Esbling, Raûschling, Riesling-Sylvaner, des années 1950 à 1952. Leurs résultats étaient les suivants :

Acides aminés trouvés :

Glycocolle	Presque toujours présent.
Alanine	Dominant.
Ac. γ amino-butyrique	Toujours présent.
Valine	Presque toujours présent.
Leucine	Quelquefois présent, toujours en petite quantité.
Sérine	Presque toujours présent, en quantité notable.
Thréonine	Presque toujours présent, en quantité notable.
Histidine	Trouvé 1 seule fois.
Arginine	Irrégulièrement présent, et en faible quantité.
Ac. aspartique	Toujours présent.
Ac. glutamique	Toujours présent, en grande quantité.
Proline	Toujours présent, en grande quantité.
Tyrosine	Trouvé 1 seule fois.
Phénylalanine	Rarement trouvé, seulement à l'état de traces.

Les auteurs trouvent peu de différence dans la composition en acides aminés d'un vin et du moût correspondant. Par contre, ils constatent de grandes différences aussi bien entre les vins de même année et d'origine différente, qu'entre les vins de même origine, mais d'année différente. Ces différences sont d'ordre quantitatif aussi bien que qualitatif. C'est à ces différences que LÜTHI et VETSCH attribuent les irrégularités observées dans l'élaboration des vins, en particulier en ce qui concerne le développement du *Bacterium gracile*, agent de la fermentation malo-lactique. LÜTHI (11) a d'ailleurs récemment repris cette étude (1957) et constate que, après cette fermentation, on observe une forte diminution de l'alanine et une plus faible diminution du glycocolle, de l'acide glutamique, de l'acide γ amino-butyrique, de la proline et de l'arginine.

Quant à l'évaluation quantitative de quelques acides aminés, les valeurs indiquées par LÜTHI et VETSCH sont les suivantes :

en mg/l	Rauschling 52	Clevner 52
ac. aspartique	env. 6	6
ac. glutamique	10 — 15	3 — 6
sérine	1 — 3	traces
glycocolle	5 — 8	5 — 7
thréonine	20 — 25	20 — 25
alanine	> 100	50 — 75

En 1954, HENNIG et FLINTJE (12) ont fait paraître le résultat de leurs travaux sur des vins allemands.

Par chromatographie à 2 dimensions (phénol-eau et propanol-eau) ils ont trouvé 17 acides aminés ; s'ils retrouvent tous les acides aminés signalés par les auteurs précédents, leurs résultats diffèrent cependant de ceux de LÜTHI et VETSCH sur un certain nombre de points, en particulier en ce qui concerne les acides aminés basiques. Ils trouvent en effet, que l'arginine est, avec l'alanine et la proline, un des acides aminés les plus abondants dans les vins. L'histidine se rencontre également fréquemment, et parfois, la lysine.

Ils signalent également la présence, dans quelques échantillons, de méthionine, d'isoleucine, et de tyrosine ; et aussi le fait que le glycocolle n'est pas nécessairement présent.

Les moûts se sont révélés être d'une teneur en acides aminés plus faible que les vins, ce qui montre que les acides aminés sont cédés par la levure au vin.

Les auteurs, s'appuyant sur les travaux faits sur les protéines de la levure, montrent qu'elles sont constituées des mêmes acides aminés que ceux que l'on rencontre dans le vin, qui contient cependant en plus, en grande quantité, la proline et l'acide γ amino-butyrique. Ils constatent également que la fermentation ne provoque pas les mêmes phénomènes dans tous les moûts étudiés, que les acides aminés ne sont en général enlevés qu'en partie, mais effectivement réapparaissent ensuite en quantité supérieure. La proline ne se trouve dans le moût qu'en faible concentration, et augmente fortement au cours de la fermentation.

Enfin, ils trouvent pour des vins rouges une composition comparable à celle des vins blancs.

Au Portugal, en 1954 également, ALMEIDA (13) a examiné les dépôts d'échantillons de vin de Porto, au point de vue de la composition des protéines les constituant. Il a observé, après hydrolyse, des taches de tyrosine, phénylalanine, lysine, acides aspartique et glutamique, alanine, méthionine, valine, leucine, des traces de tryptophane et une tache mal définie de proline. Il ne donne pas de résultats en ce qui concerne les acides aminés libres dans ces vins.

En Italie, TARANTOLA (14) a étudié en 1954, les acides aminés de 9 vins rouges des récoltes 1950 à 1953, par chromatographie ascendante bidimensionnelle avec les solvants suivants : propanol-eau ; phénol saturé d'eau. Les acides aminés qui se retrouvent dans tous les cas sont, par ordre d'intensité décroissante des taches de :

proline, alanine, glycocolle, acide glutamique (manque dans 1 vin), acide aspartique, lysine, sérine.

Se rencontrent fréquemment :

acide γ amino-butyrique, thréonine.

Se rencontrent rarement :

histidine, asparagine, cystine, leucines, valine, tyrosine, ornithine, histamine.

L'un des vins, resté sur lies, se montrait être enrichi en valine, leucine et tyrosine.

PROCOPIO et CALÉ (15) ont travaillé en 1955, sur une dizaine de vins, rouges et blancs, d'origines différentes, et des années 1947 à 1950. Ils ont utilisé la chromatographie à deux dimensions, avec phénol ammoniacal et collidine-lutidine.

Ils constatent que les vins rouges sont plus riches en acides aminés que les vins blancs, qualitativement et quantitativement. Les seuls acides aminés *toujours* présents sont la proline, l'alanine, l'acide glutamique, en quantités importantes.

Sont en *général* présents :

l'acide γ amino-butyrique (sous forme de traces), le glycocolle, la sérine (traces), l'acide aspartique.

Sont *quelquefois* présents :

la β-alanine (signalée seulement dans les échantillons de vins rouges), les leucines, la valine, les acides aminés basiques (arginine, lysine).

N'ont *jamais* été trouvés :

les acides aminés aromatiques, et la thréonine.

Contrairement aux résultats de LÜTHI et VETSCH, les auteurs constatent donc de grandes différences entre les vins.

En 1955 également, DIMOTAKIS (16) a étudié 11 vins grecs, par chromatographie ascendante bi-dimensionnelle (phénol-acide, butanol acétique). Il indique 17 acides aminés, irrégulièrement distribués qualitativement et quantitativement. Il ne constate pas entre les vins rouges et blancs une différence aussi nette que PROCOPIO et CALÉ ; la richesse en acides aminés varie avec différents facteurs, tels que la variété du raisin, l'époque de la vendange, le mode de vinification, la durée et les conditions de la fermentation, le stade de vieillissement et les phénomènes microbiens.

Il indique néanmoins comme acides aminés dominants : la proline, l'alanine, l'acide glutamique, l'acide aspartique. Puis par ordre d'importance décroissante, d'après une classification basée

sur la fréquence d'apparition des taches sur les chromatogrammes et la dimension de ces taches : histidine, leucine, sérine, glycocolle, acide γ amino-butyrique, oxyproline, cystine, valine, méthionine, thréonine, arginine, norvaline, tryptophane.

On remarque donc que l'auteur indique l'existence d'oxyproline, de cystéine et de norvaline (traces) qui n'ont pas été signalées précédemment par d'autres auteurs.

Par contre, il ne signale que rarement l'arginine, qui semble moins répandue que l'histidine, et jamais la lysine.

Carballo (17), en 1956, a travaillé sur des moûts et vins espagnols du type vin de consommation courante et du type Xérès, ceux-ci vieillis sous voile de levures et restés sur lies. Il a utilisé la séparation sur échangeurs d'ions et la chromatographie à une dimension en utilisant différents solvants, par la méthode de Mc Farren.

Dans les vins de la région de la Rioja, vinifiés en rouge et en blanc à partir de raisins rouges, il a déterminé les acides aminés suivants :

— en quantité très abondante, la proline ;

— en quantité importante, l'alanine, la tyrosine, l'acide γ amino-butyrique ;

— en quantité moindre, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine, le glycocolle, les leucines, le groupe histidine + arginine ;

— en traces, la phénylalanine, le groupe valine + méthionine, la thréonine.

La composition qualitative des vins rouges ou blancs est sensiblement la même, on ne remarque qu'une différence quantitative.

Par contre, il existe une différence importante entre les vins de consommation courante et ceux du type « Manzanilla », faits sous voile de levures. La différence porte aussi bien sur la nature des acides aminés que sur leurs proportions. Le voile de levures semble transformer plus facilement certains acides aminés que d'autres : en particulier la proline a disparu presque totalement, par l'effet du métabolisme oxydatif de la levure. La plupart des autres acides aminés s'y trouvent en quantité beaucoup plus faible. Il est vrai que la teneur en N total, par le procédé Kjeldahl, est beaucoup plus faible pour ce dernier vin : dans les échantillons étudiés, elle était de 346,5 mg/l pour le vin de la Rioja, 77 mg/l seulement pour le Manzanilla.

Un travail plus récent a été fait par Prillinger en Autriche (1957) (18). Il n'obtient pas séparés les acides aminés basiques, arginine, histidine et lysine, mais pense que l'arginine domine, jusqu'à ce qu'elle tombe dans le dépôt du vin. La méthionine est toujours présente, mais diminue au fur et à mesure du vieillissement du vin, ainsi que la thréonine, la cystine et la tyrosine. Il signale l'existence, dans les vins jeunes seulement, de lanthionine ; l'asparagine et l'acide cystéique se rencontrent en petites

quantités dans les vins étudiés. Une tache non déterminée peut être la glutamine. Le glycocolle, la valine et l'acide γ amino-butyrique se rencontrent toujours en quantité appréciable.

Il constate que l'on peut rencontrer dans les vins une vingtaine d'acides aminés, que, pratiquement, ils sont présents dans tous les vins, mais qu'on ne peut pas les déterminer s'ils sont en quantité trop faible.

En 1958, CARLES, LAMAZOU-BETBEDER et PECH (19) ont publié un travail sur les acides aminés libres existant dans les vins, préparés à partir d'un seul cépage : utilisant la chromatographie bi-dimensionnelle sur papier, ils ont mis en évidence une trentaine d'acides aminés, en incluant les amides mais non les peptides : proline, hydroxyproline, α et β alanine, leucine et isoleucine, lysine, histidine, arginine, acide aspartique,acide glutamique, acide γ amino-butyrique, valine,glycocolle, sérine, thréonine, tyrosine, phénylalanine, acide pipécolique, tryptophane, ornithine, cystéine, méthionine, asparagine, glutamine, acide pyrrolidone-carboxylique, acide hydroxypipécolique, hydroxyleucine, méthionine sulfone, histamine et un inconnu assez abondant qui se place contre la proline.

D'après ces auteurs, la proline est extrêmement abondante dans le vin nouveau (8 à 40 p. 100 de l'ensemble des acides aminés) puis sa teneur baisse ; au contraire, les acides aminés aromatiques, tyrosine, phénylalanine et tryptophane augmentent avec le temps, l'α alanine est toujours importante (7 à 15 p. 100 de l'ensemble des acides aminés), le vin rouge est nettement plus riche en peptides, en acides iminés (en proline surtout), mais moins riche en valine, leucines et acides aminés aromatiques. Il note également des différences dans la teneur en acides aminés suivant les cépages.

Les travaux de CASTOR (20), sur les moûts de Californie, sont plus anciens (1953) mais présentent un grand intérêt du fait que l'étude des acides aminés par voie microbiologique constitue un contrôle de la méthode chromatographique, et de nombreux résultats quantitatifs ont pu ainsi être obtenus.

Il a étudié les moûts de Cabernet, Colombard, Sauvignon blanc, Flame Tokay.

Les acides aminés trouvés sont les suivants, les résultats étant exprimés en mg/100 ml de moût :

Ac. glutamique	33,5	à	106,7	
Arginine	7	à	15,2	(dans 1 cas : 103)
Histidine	5,7	à	14,5	
Isoleucine	3,1	à	10	
Leucine	4,2	à	7,7	
Valine	4,1	à	9,4	
Ac. aspartique	2,2	à	9,9	
Phénylalanine	2,9	à	7,8	
Tryptophane	2,2	à	6,5	
Tyrosine	0,7	à	4,6	
Lysine	1,1	à	2,0	
Méthionine	1,1	à	1,8	
Glycocolle	0,3	à	1,4	
Cystine	0,2	à	0,5	

On remarquera cependant que les deux acides aminés qui semblent les plus répandus, tout au moins dans les vins, l'alanine et la proline, ne sont pas mentionnés. Pendant la fermentation, 75 à 90 p. 100 des acides aminés sont enlevés du moût. Seuls restent inchangés le glycocolle, la lysine et la cystine. Certains se retrouvent en petite quantité après la fermentation, ce sont : la valine, la leucine, l'isoleucine, le tryptophane et la tyrosine.

Castor et Archer (21), en 1956, ont combiné les méthodes microbiologique et chromatographique et ont trouvé que, dans le moût de « French Colombard », les acides aminés les plus abondants étaient, par ordre d'importance décroissante : proline, arginine, sérine, acide glutamique, thréonine. Ce sont encore les plus abondants dans les vins jeunes.

En 1957, les mêmes auteurs (22) ont étudié le rôle des acides aminés dans la formation du voile formé par *Saccharomyces beticus* à la surface du Sherry. L'arginine et la proline sont les plus efficaces ; parmi ceux qui présentent encore une activité certaine, quoique moins importante, on note : acide aspartique, acide glutamique, isoleucine, sérine, thréonine, tryptophane.

L'acide aspartique, la proline, la sérine et la thréonine sont précisément les acides aminés restant dans le vin jeune en quantité importante.

Il est bien difficile de tirer une conclusion de ces nombreux travaux. Ceci s'explique en partie par la différence des méthodes employées, certaines méthodes de purification pouvant retenir des acides aminés en quantité importante ; et également par l'hétérogénéité des échantillons, leur stade de vieillissement, le mode de préparation des vins étudiés, la présence ou l'absence d'une fermentation malo-lactique. etc. Certains auteurs trouvent le moût plus riche que le vin en acides aminés, pour d'autres la levure cède au vin une quantité d'acides aminés supérieure à celle enlevée par la fermentation.

Tous les auteurs s'accordent pour donner à l'azote aminé une place importante parmi les matières azotées du vin. Mais leurs résultats divergent bien souvent quant à la nature et à l'importance des acides aminés dans les cas particuliers étudiés.

II. — RÉSUMÉ DES TRAVAUX PAR ACIDES AMINÉS

a) Acides aminés aliphatiques.

1e Acides aminés neutres.

— *Le glycocolle*, a été trouvé par la plupart des auteurs, en quantité assez faible, il peut manquer cependant. Dans les moûts de Californie, Castor indique une teneur de 3 à 14 mg/l ; Lüthi et Vetsch 5 à 8 mg/l

dans les vins blancs suisses. Cet acide aminé ne semble varier ni au cours de la fermentation alcoolique ni au cours du vieillissement des vins.

— *L'α alanine* est de l'avis général, un des deux acides aminés prédominants, après la proline. CASTOR ne l'a pas recherchée par dosage microbiologique, mais LÜTHI et VETSCH ont trouvé de 50 à plus de 100 mg/l dans leurs vins. CARLES et coll. constatent que sa teneur augmente dans les vins. D'autres auteurs constatent que sa teneur diminue dans les vins, ce qui peut s'expliquer par le fait que la fermentation malolactique a eu lieu ; en effet depuis les travaux de LÜTHI et VETSCH (1953) et LÜTHI (1957) on sait que l'alanine est un des acides aminés qui semble nécessaire au développement de *Bacterium gracile*, qui l'assimile et ainsi le fait disparaître du milieu.

— *La β alanine*, n'a été signalée que par PROCOPIO et CALÉ, et CARLES et coll.

— *La valine*, se rencontre irrégulièrement : parfois seulement sous forme de traces (CARBALLO, PROCOPIO et CALÉ), parfois en assez grande quantité mais seulement dans certains vins (TARANTOLA, SISSAKYAN et BEZINGER). LÜTHI et VETSCH la signalent dans presque tous les échantillons étudiés. D'après CARLES et coll. les vins rouges sont moins riches en valine et en leucine. La valine, assez importante dans les moûts et les vins jeunes, disparaît dans les vins vieux. CASTOR indique pour la valine, dans les moûts de Californie, la quantité assez importante de 41 à 94 mg/l.

Seul DIMOTAKIS signale l'existence de *norvaline*.

— *Les leucines* (leucine et isoleucine) sont difficiles à séparer l'une de l'autre par chromatographie. CASTOR a montré l'existence de ces 2 formes, en quantité importante, dans les moûts étudiés : 45 à 100 mg/l pour l'isoleucine, 42 à 77 pour la leucine.

HENNIG les a cependant distinguées, mais d'après lui, l'isoleucine est un des acides aminés qui sont à la plus faible concentration. TARANTOLA, PROCOPIO et CALE, LÜTHI et VETSCH les considèrent ensemble et trouvent qu'elles sont présentes irrégulièrement et faiblement. DUPONT, CARLES et coll. cependant les trouvent en quantité assez importante dans les moûts de la Drôme ou les vins de Fronton.

La leucine semble disparaître dans les vins jeunes.

— *La sérine* a été trouvée par tous les auteurs, mais non dans tous les vins ; parfois seulement sous forme de traces (PROCOPIO et CALÉ) ou en quantité plus importante (DIMOTAKIS, TARANTOLA).

LÜTHI et VETSCH ont trouvé seulement de 1 à 3 mg/l dans le Rauschling 1952, des traces dans le Clevner 1952.

— *La thréonine*, semble se rencontrer assez fréquemment également, mais en quantité encore plus faible (DIMOTAKIS, CARBALLO). Cependant, LÜTHI et VETSCH l'ont, dans leurs échantillons, évaluée à 20-25 mg/l pour les deux vins étudiés.

Dans un travail récent, CASTOR et ARCHER ont signalé qu'elles étaient présentes en quantité abondante dans les moûts et les vins jeunes (sérine : 50 mg/100 ml de moût, thréonine : 20 mg/100 ml de moût et 10 mg/100 ml de vin jeune).

La thréonine diminue très fortement par suite du vieillissement du vin (LÜTHI, PRILLINGER), ce qui explique les grandes variations constatées selon les auteurs et les vins étudiés.

2° Acides aminés soufrés.

La cystine, la cystéine ou plutôt l'acide cystéique et la *méthionine*, n'ont été que rarement signalés. Ils n'ont pas été déterminés d'une manière certaine avant HENNIG (1954). De ces trois acides aminés, c'est la méthionine qui semble le plus répandu.

D'une façon générale, ils semblent n'être présents qu'en petite quantité, et seulement dans certains vins ; d'après PRILLINGER ils apparaissent en grande quantité à la fermentation, puis diminuent beaucoup pendant le vieillissement, exception faite de l'acide cystéique dont la faible teneur semble à peu près constante. Le même auteur signale également, pendant la fermentation, la présence de la *lanthionine*, qui ne semble plus se retrouver par la suite.

CASTOR a étudié la cystine et la méthionine dans les moûts, il indique des teneurs de 2 à 5 mg/l pour la première, et de 11 à 18 mg/l pour la seconde. Pour lui, la cystine ne varie pas du fait de la fermentation. Il est possible que ce soit seulement le manque de sensibilité de la méthode utilisée qui empêche de reconnaître la méthionine. Celle-ci s'oxyde en effet pour donner 3 taches différentes sur les chromatogrammes à deux dimensions, et ainsi se disperse et peut passer facilement inaperçue (DENT) (23). De plus, elle interfère, avec la plupart des solvants, avec la valine, et il est assez difficile de l'en séparer.

3° Acides aminés dicarboxyliques.

— *L'acide aspartique* est aussi toujours présent, sauf chez certains vins italiens étudiés par PROCOPIO et CALÉ, mais en quantité un peu inférieure à l'acide glutamique. CASTOR indique une teneur beaucoup plus faible que pour ce dernier, de 22 à 99 mg/l. Les chiffres de LÜTHI et VETSCH sont dans ce cas encore très différents de ceux de CASTOR : 6 mg/l dans les 2 vins étudiés.

Il est vrai cependant que tous les auteurs indiquent une forte diminution des deux acides aminés dicarboxyliques au cours de la fermentation.

— *L'acide glutamique* est toujours présent en quantité importante ou tout au moins appréciable. Il ne manque pratiquement dans aucun

vin, sauf dans certains anormalement pauvres en N aminé. Teneurs indiquées :

par CASTOR (moûts), 335 à 1 067 mg/l ;

par LÜTHI et VETSCH (vins), 3-6 mg, 10-15 mg/l.

Il faut évidemment tenir compte de la très grande différence des méthodes utilisées, microbiologique d'une part, évaluation chromatographique d'autre part, pour expliquer cette différence considérable, qui n'apparaît pas par comparaison de chromatogrammes de moûts et de vins.

— *L'asparagine* et *la glutamine*, amides des acides aspartique et glutamique, ont été parfois rencontrées. TARANTOLA, CARLES et coll., ont dans quelques cas trouvé de l'asparagine, comme PRILINGER et SISSAKYAN et BEZINGER (4) qui signalent également la présence possible de glutamine, sans l'avoir nettement caractérisée. Dans un bilan de matières azotées dans les moûts et les vins jeunes, HENNIG et OSHKE (25) indiquent comme teneur totale de N amidé pour 2 moûts, respectivement 34 et 16 mg/l.

— *L'acide γ amino-butyrique*, produit de la décarboxylation de l'acide glutamique, a été indiqué par tous les auteurs, sauf VALAIZE et DUPONT et ALMEIDA : il se trouve en quantité, en général, assez élevée. Il n'est cependant pas présent dans tous les vins. On le trouve, en général, en forte quantité dans les moûts (LÜTHI et VETSCH, CARBALLO).

4° **Acides aminés basiques.**

C'est pour les acides diaminés que les résultats publiés diffèrent le plus. Peut-être est-ce dû à la difficulté relative de leur séparation, qui dépend étroitement du pH des solvants utilisés. SISSAKYAN, BEZINGER et leurs collaborateurs, VALAIZE et DUPONT, puis DUPONT, n'en ont signalé aucune trace.

— *La lysine* a été trouvée irrégulièrement et presque toujours en faible quantité, sauf par TARANTOLA qui la signale en quantité importante dans des vins relativement jeunes, de 1952 et 53. CASTOR a trouvé dans les moûts 11 à 20 mg/l.

— *Pour l'arginine*, les résultats ont été, dans beaucoup de cas, faussés par le fait des traitements de purification des échantillons. L'arginine peut, d'une part être retenue sur certains échangeurs d'ions, à cause de sa forte basicité, ainsi d'ailleurs que la lysine ; d'autre part, il est reconnu que le procédé de désionisation électrolytique de CONSDEN, GORDON et MARTIN, la détruit par transformation partielle en ornithine. Cependant, l'*ornithine* n'a été trouvée qu'exceptionnellement, une seule fois par TARANTOLA et plusieurs fois dont une de façon importante (environ 10 p. 100 des acides aminés) par CARLES et coll.

PRILLINGER suggère que l'affaiblissement de la tache d'arginine

pourrait être due au dépôt de cet acide aminé ; cependant ALMEIDA ne l'a pas identifié dans les lies qu'il a étudiées.

L'arginine semble le plus répandu des acides diaminés. Pour HENNIG, c'est un des acides aminés dominants des vins allemands qu'il a examinés, au même titre que l'alanine et la proline ; il ne se rencontre pas dans les moûts, mais est libéré par les levures après la fermentation.

Cependant, dans les moûts de Californie, CASTOR en signale une forte teneur : 70 à 152 mg/l et même, dans un cas, 1 030 mg/l. Dans ses travaux plus récents (22), il signale à nouveau l'arginine comme un des plus abondants acides aminés dans les vins jeunes. PRILLINGER en trouve une beaucoup plus forte quantité dans les vins jeunes que dans les vins après vieillissement. Par contre d'autres auteurs (PROCOPIO et CALÉ, TARANTOLA) ne la trouvent que rarement, et ALMEIDA ne l'a pas détectée par hydrolyse du dépôt de vin de Porto.

— *L'histidine* n'est pas présente dans tous les vins. Elle manque dans beaucoup de cas, ou peut être présente à l'état de traces (LÜTHI, HENNIG, TARANTOLA) ou en quantité moyenne (CARBALLO, DIMOTAKIS). Pour CASTOR, elle existe en quantité assez importante dans les moûts : 57 à 143 mg/l.

L'histidine n'apparaît par révélation à la ninhydrine qu'en quantité déjà importante (25 µg d'après PRATT et AUCLAIR dans LEDERER (44)). De plus faibles teneurs peuvent donc passer inaperçues.

b) **Acides aminés aromatiques.**

Les acides aminés aromatiques, tyrosine, phénylalanine et tryptophane paraissent augmenter avec le temps d'après CARLES et coll., qui écrivent également que les vins rouges sont moins riches en acides aminés que les vins blancs.

— *La phénylalanine* est absente ou à l'état de traces. Seul DUPONT en signale des quantités assez importantes ; les auteurs italiens et DIMOTAKIS ne l'ont pas caractérisée.

Résultats de CASTOR : 29 à 78 mg/l. La fermentation ne semble pas lui faire subir de changement notable, d'après les tableaux de CARBALLO.

— *La tyrosine* peut manquer, ou être présente à faible dose, ou en quantité moyenne ; DUPONT et CARBALLO, dans les moûts et les vins, l'ont trouvée en quantité appréciable. LÜTHI et VETSCH ne la signalent pas dans les moûts suisses, mais en faible quantité dans les vins. D'autres auteurs ne l'ont caractérisée dans aucun de leurs échantillons (DIMOTAKIS, PROCOPIO et CALÉ, SISSAKYAN et BEZINGER). CASTOR, par dosage microbiologique, a trouvé 7 à 46 mg/l. Elle semble disparaître dans les vins vieux.

c) Acides aminés hétérocycliques.

— *Le tryptophane,* reconnu par les auteurs russes par une méthode microbiologique, et dosé par CASTOR dans les moûts, où il se trouvait en quantité assez importante (22 à 65 mg/l) n'a que très rarement été mis en évidence par chromatographie. Il n'est signalé que par ALMEIDA dans les lies, DIMOTAKIS, qui l'a trouvé dans un seul des échantillons étudiés, et CARLES et coll. qui l'ont mis en évidence dans tous les échantillons analysés sauf un (24). SISSAKYAN, EGOROV et PUCHKOV (1950) l'ont également dosé dans les vins, au moyen de *Lactobacillus arabinosus,* mais n'ont pas trouvé de valeur supérieure à 6,4 mg/l.

D'après CASTOR, le tryptophane fait partie des acides aminés qui disparaissent du moût par fermentation, puis y retournent en petite quantité. Sa sensibilité à l'hydrolyse le rend difficile à détecter.

— *La proline,* occupe une place à part. Dès les premiers travaux sur les acides aminés du vin, c'est-à-dire ceux de SISSAKYAN et BEZINGER, on a reconnu son importance. Elle s'accumule en grande quantité dans le vin et ne manquait dans aucun des échantillons étudiés ; il est cependant très intéressant de noter que d'après les résultats de CARBALLO, elle a presque disparu dans l'Amontillado étudié, c'est à-dire le vin sur lequel se développent des levures en phase oxydative. Egalement en se rapportant au tableau extrait de SISSAKYAN et BEZINGER, on voit que dans certains vins russes, la proline diminue au cours du vieillissement du vin jusqu'à disparition complète. De même, d'après CARLES et coll. la proline, très importante dans les vins nouveaux (30 p. 100) diminue progressivement au cours du vieillissement presque jusqu'à disparition : d'après ces auteurs, la présence d'acide pyrrolidone-carboxylique témoignerait de sa dégradation vers l'acide glutamique. Ce cas n'est d'ailleurs pas général. Tous les auteurs ayant comparé des moûts et des vins (SISSAKYAN et BEZINGER, HENNIG, LÜTHI et VETSCH, CARBALLO) signalent que la teneur en proline augmente beaucoup par suite de la fermentation. D'après les travaux des auteurs russes (1953), la proline est absente du moût. Par contre, CASTOR et ARCHER ne constatent pas de changement notable selon le stade de la fermentation. Ils indiquent une teneur de 350 mg/100 cc de moût (French Colombard de Californie) au début de la fermentation, ce chiffre ne subissant par la suite que de faibles variations (La courbe n'a été suivie que jusqu'à 140 heures).

Exprimées en proline et non plus en N, les teneurs indiquées par SISSAKYAN et BEZINGER, sont les suivantes :

Vin de 1949 : après :	
6 jours	398 mg/l
66 jours	246 mg
385 jours	0
Vin de 1950 : après :	
76 jours	312 mg/l
246 jours	293 mg

La teneur maximum qu'ils ont signalée est celle de vins de Kakhétie de 1950 : 993 mg après 3 jours de fermentation, tombée à 500 mg après 252 jours. SISSAKYAN et BEZINGER pensent que la proline pourrait se trouver dans le moût à l'état lié, et être libérée par les peptidases des levures. Cependant, l'azote peptidique ne semble pas toujours diminuer proportionnellement à l'augmentation de la proline.

— *L'hydroxyproline*, par contre n'a été signalée que par DIMOTAKIS et CARLES et coll.

— *L'acide pipécolique*, accompagné de son dérivé hydroxylé, l'acide hydroxypipécolique, n'a été signalé que par CARLES et coll.

De tous ces travaux on peut déduire que le moût est en général plus riche que le vin, et que tous les acides aminés se trouvant déjà dans le moût, sont pris par la levure pendant la fermentation, puis y retournent. On n'observe au cours du vieillissement aucune accumulation d'un acide aminé différent de ceux déjà caractérisés dans le moût, excepté quelques traces des acides aminés rarement signalés (lanthionine, β alanine, hydroxyproline) ou des amides (asparagine, glutamine) qu'on ne trouve encore qu'en faible quantité, et qui pouvaient être présents dans les moûts et avoir échappé aux recherches (HENNIG et OSHKE indiquent une teneur faible mais non négligeable d'azote amidé dans les moûts).

Les vins rouges sont nettement plus riches en peptides que les vins blancs, et plus riches en acides iminés (proline surtout) mais moins riches en valine, leucines et acides aromatiques (19).

Citons pour finir quelques cas particuliers de vieillissement :

— TARANTOLA a vérifié séparément deux échantillons du même moût (Freisa), l'un restant au contact de ses lies. Il a observé dans ce cas un accroissement de la teneur en valine, leucine et tyrosine, qui doivent donc provenir de l'autolyse des levures.

— Enfin, CARBALLO puis CASTOR et ARCHER, ont étudié la répercussion de la croissance d'un voile de levures sur le métabolisme des acides aminés. Comme résultat, CARBALLO note, comme nous l'avons déjà vu, la disparition de la proline, CASTOR et ARCHER remarquent que ce sont l'arginine et la proline qui favorisent le plus la croissance du voile.

III. — TRAVAUX PERSONNELS

a) Méthodes employées.

Séparation des acides aminés. (D'après SAMUELSON (26)).

Les acides aminés ont été séparés par passage sur un échangeur de cations, Dowex 50, qui sous la forme acide absorbe sélectivement les acides aminés et peptides courts, ensuite élués par NH_3. 10 ml de vin sont

versés sur une colonne de 15 cm de hauteur et 1 cm de diamètre, remplie de la résine sous sa forme H^+ ; les substances non chargées sont entraînées par 100 ml d'eau, et les acides aminés fixés sur la colonne sont élués par 80 ml de NH_3, 1N (ils ne passent que dans la fraction alcaline, et non dans la fraction neutre). L'éluat est concentré sous vide, l'extrait sec est repris par 2 ml d'eau, conservé à la glacière avec un cristal de thymol, et sert aux différents dosages et caractérisations.

Les prises d'essai pour la chromatographie ont été en général de 25 µl ce qui correspondait à 0,125 ml de vin.

Pratique de la chromatographie.

On a utilisé la chromatographie descendante à 2 dimensions, méthode classique de CONSDEN, GORDON, MARTIN (27), avec emploi du papier Whatman n° 1.

Les solvants ont été le butanol -acétique et le phénol, essayés dans différentes conditions :

— le butanol acétique saturé d'eau (80 : 20 : 100) donnait des Rf d'une valeur beaucoup moins constante que celle obtenue par le solvant non saturé, préparé dans les proportions suivantes : butanol-acide acétique-eau 4 : 1 : 1.

— le phénol a été utilisé à différents pH :

1. — en milieu alcalin : 100 ml + 0,25 ml. NH_3 + 2 ml d'une solution d'α-benzoïnoxime à 5 p. 100 dans l'alcool,

2. — en milieu acide, en tamponnant le phénol et le papier (SUBRAMANIAN et LAKSMINARAYAN (28) :

à pH 1.
phénol 50 ml.
tampon KCl - HCl 0,2 M : 7 ml.
α-benzoïnoxime : 1 ml d'une solution à 5 p. 100 dans l'alcool à 95°.

Le papier est tamponné en faisant ruisseler 200 ml environ de la même solution tampon sur la feuille posée sur une plaque de verre, et en laissant sécher à l'air.

— à pH 4 (MC FARREN (10)), le tampon est préparé dans les proportions suivantes : 15,42 ml $PO_4H\,Na_2$, 12 H_2O, 0,067 M + 12, 92 ml acide citrique, 1 H_2O, 0,067 M ; on procède de la même manière que ci-dessus.

Chacun de ces solvants présente des avantages et des inconvénients ; dans le phénol ammoniacal, les acides aminés basiques se déplacent trop rapidement et forment une longue traînée, mais les autres acides aminés sont bien séparés. Les basiques donnent des taches beaucoup plus distinctes avec le phénol à pH 1, mais les acides aspartique et glutamique

ont tendance à interférer avec le glycocolle et la sérine. A pH 4, la séparation générale est bonne, quoique le glycocolle et l'acide glutamique d'une part, la tyrosine et l'acide γ-aminobutyrique d'autre part, ne donnent qu'une tache étirée plutôt que deux taches distinctes.

Nous avons donc comparé pour l'identification des acides aminés, les données obtenues avec ces différents solvants, mais les dosages ont été faits exclusivement à partir des chromatogrammes obtenus avec le phénol tamponné à pH 4.

On a aussi utilisé la chromatographie descendante à une dimension avec pour solvant le butanol-acétique aqueux, pour faire différentes réactions caractéristiques de certains acides aminés (acides aminés soufrés, histidine, arginine, tyrosine).

Analyse qualitative des acides aminés :

Après séchage, les chromatogrammes sont pulvérisés avec une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 dans du butanol saturé d'eau, et additionné de collidine dans la proportion de 2 p. 100. La révélation se fait par séchage à l'étuve 3 à 5 minutes à 80°.

En dehors de leur détermination à l'aide du Rf, un certain nombre d'acides aminés peuvent être reconnus, sur le chromatogramme, par une réaction spécifique après pulvérisation des réactifs appropriés (MACPHERSON (29)).

— *l'arginine* : par la réaction de SAKAGUCHI (α naphtol-urée-hypobromite).

— *l'histidine* : par le réactif de PAULY (acide sulfanilique-nitrite de sodium) ;

— *la tyrosine* : possède la même propriété que l'histidine (DENT (23)) et peut être aussi caractérisée par l'α-nitroso-β-naphtol dans l'acide nitrique (GERNGROSS, VOSS et HERFELD, dans BLOCK et BOLLING (30)).

— *les acides aminés soufrés* : par pulvérisation d'un réactif à l'iodoplatinate de potassium. (WINEGARD et TOENNIES (31)). Mais l'histidine donne également un test positif pour cette réaction.

— *la cystine* et la *cystéine* peuvent de plus être détectées par réaction au nitroprussiate de sodium, précédée, pour la cystine, par une réduction par le cyanure de sodium (réaction du groupe SH) (HAWK, OSER, SUMMERSON (32)).

Analyse quantitative.

Nous avons d'abord essayé la méthode de SMITH et AGIZA (33), modification de celle de LANDUA et AWAPARA (34) : elle consiste à localiser les acides aminés par une révélation peu poussée, puis à éluer les taches ainsi repérées, et à terminer la coloration par une solution plus

concentrée de ninhydrine, dans des conditions déterminées. On évalue l'intensité de la coloration au photocolorimètre, après avoir établi des courbes de références.

Malheureusement, cette méthode nous a donné des chiffres beaucoup trop importants pour les témoins, ce qui rendait sans valeur les résultats obtenus pour les acides aminés eux-mêmes. La modification indiquée par FOWDEN et PENNEY (35) (lavage des chromatogrammes par un alcali dilué) n'a apporté aucune amélioration.

Nous avons donc adopté la méthode de THOMPSON, ZACHARIUS et STEWARD (36-37), dans lequel le développement de la couleur se fait en atmosphère saturée d'alcool et de CO_2 ; le procédé utilisé est le suivant :

Le chromatogramme après écoulement successif des deux solvants, est très soigneusement séché, jusqu'à ce qu'il ne reste plus trace des solvants. Il est régulièrement pulvérisé avec une solution de ninhydrine à 1 p. 100 dans le butanol saturé d'eau et révélé dans l'étuve préalablement amenée à 60° et saturée de CO_2 et d'alcool. Après 35 minutes, on admet qu'on a atteint le maximum de coloration pour toutes les taches. On découpe donc les taches et on élue la coloration dans 5 ml d'alcool à 50 p. 100. Plutôt que d'utiliser la méthode classique de pesée des surfaces ainsi découpées, pour soustraire le chiffre du témoin, nous avons jugé préférable de découper autant de témoins que de groupes de taches en les prenant de la même surface que celles-ci, et le plus près possible d'elles ; le fond en effet est loin d'être toujours incolore ou de coloration homogène. Après une 1/2 heure minimum de contact avec l'alcool, on mesure les colorations au photocolorimètre, à 575 mμ, sauf pour la proline qu'on mesure à 440 mμ.

On a établi des courbes de référence pour chacun des acides aminés identifiés, pour des quantités allant de 5 à 20 μg sauf pour les acides aminés réagissant faiblement avec la ninhydrine, tyrosine et phénylalanine, pour lesquels on a pris des quantités doubles, et pour la proline étudiée à des concentrations de 100 à 400 μg.

Pour les acides aminés possédant une réaction spécifique, on peut avoir une estimation semi-quantitative en chromatographiant des quantités croissantes du corps pur en même temps qu'une partie aliquote des éluats d'acides aminés. Pour l'arginine, on a ainsi une vérification de la méthode à la ninhydrine ; pour l'histidine, la méthionine et parfois la tyrosine,ce sont les seuls chiffres à prendre en considération, à cause des interférences à pH 4 avec d'autres acides aminés possèdant une réactivité très supérieure.

En ce qui concerne la réaction de la tyrosine avec l'α-nitroso-β-naphtol, le thymol utilisé comme agent conservateur développe une coloration gênante, si bien que nous n'avons pu obtenir des résultats que dans quelques cas.

b) Les résultats obtenus dans l'étude chromatographique de quelques vins blancs

Nous avons étudié des échantillons de 8 vins blancs, dans le but de déterminer leur teneur en acides aminés les plus courants et les plus abondants, sans chercher à identifier les très faibles taches ne correspondant pas aux acides aminés habituellement décrits ou facilement localisables. Les vins étudiés sont les suivants :

— 2 vins jaunes du Jura : Château-Châlon 1942-49, (CC 16) et Arbois 1945-55 (CC 24).

— 1 Xérès du commerce d'origine non définie (X).

— 2 vins d'Alsace, Riesling 1956 (R) et Traminer 1956 (TR) venant de la Station œnologique de Colmar.

— 1 Chablis du commerce (CH) de la récolte 1956.

— 1 vin blanc préparé à partir d'un cépage pur de Bourgogne, le Chardonnay (BE) fourni par la Station œnologique de Beaune.

— 1 vin blanc courant de coupage, du commerce (BL).

Pour cette étude nous avons fait pour chaque échantillon une série de chromatogrammes, en utilisant en général 25 µl de l'éluat concentré, avant et après hydrolyse (0,5 ml de l'éluat concentré étaient amenés à sec, repris par 0, 5 ml de Cl H 1/2 et portés en tube scellé 24 heures à l'étuve à 105°, puis évaporés et repris par l'eau). Ceci permet de déterminer les amides, détruits par hydrolyse, et certains peptides qui se trouvent scindés en acides aminés.

Pour l'étude qualitative :

— des chromatogrammes à 2 dimensions, en utilisant le butanol acétique et le phénol tamponné à différents pH.

— des chromatogrammes à 1 dimension pour les réactions spécifiques dans le butanol acétique.

Pour l'étude quantitative :

— des chromatogrammes à 2 dimensions, avec pour premier solvant le phénol tamponné à pH 4, en utilisant différentes concentrations, en général 25 et 50 µl de l'éluat. La révélation se fait selon la méthode de Thompson, Steward et Zacharius (36).

— des chromatogrammes à 1 dimension, dans le butanol-acétique, pour chacun des acides aminés possédant une réaction spécifique, en portant sur la même feuille une gamme croissante de l'acide aminé et les prises d'essais des éluats à étudier.

Résultats.

Les résultats sont portés sur les tableaux II et III. Ils ont été calculés de la manière suivante : dans la plupart des cas, ils représentent,

exprimée en mg/l, la moyenne des résultats trouvés pour les chromatogrammes effectués aux 2 concentrations de 25 et 50 µl d'éluat, par lecture au photocolorimètre ; à moins qu'on n'ait tenu compte que d'un seul des chiffres obtenus, celui correspondant à la meilleure zone de sensibilité de la réaction.

L'histidine a été déterminée par comparaison visuelle avec une gamme établie avec des quantités croissantes de l'acide aminé pur, et révélation spécifique. Les résultats trouvés correspondaient bien à ceux donnés par la méthode précédente, quand la tache d'histidine était distincte de celle de la lysine et pouvait donc rentrer dans le cas général. Il en est de même pour la tyrosine.

Tableau II

Teneur de 8 vins blancs en acides aminés, avant hydrolyse, exprimée en mg/l d'acides aminés.

	Blanc ordinaire B L	Xérès X	Château-Châlon CC 16	Château-Châlon CC 24	Chardonnay B E	Chablis C H	Riesling R	Traminer T R
Alanine	33	24	52	53	55	114	111	247
Valine	18	23	44	27	33	40	58	101
Leucine	32	35	77	46	56	73	71	198
Sérine	13	11	10	16	19	33	36	121
Thréonine	15	18	29	24	28	30	34	107
Sulfoxyde de Méthionine	24	—	33	44	—	32	35	27
Ac. Aspartique	27	27	—	50	29	36	51	107
Ac. glutamique + Glycocolle	65	44	58	92	78	130	180	270
Glutamine	16	—	—	5	36	—	56	310
Lysine	41	20	79	46	61	63	69	248
Arginine	25	5	75	33	10	5	100	150
Histidine	26	20	33	20	13	26	100	150
Phénylalanine	38	28	82	68	40	131	130	199
Tyrosine Acide γ Aminobutyrique	25	23	33	37 28	27	47 48	75 65	120 90
Proline	665	445	1 355	870	1 200	900	680	740
Somme des ac. aminés	1 063	723	1 960	1 455	1 735	1 808	1 851	3 185
Somme des ac. aminés — proline	398	278	605	585	485	908	1 171	2 445

TABLEAU III

Teneur de 8 vins blancs en acides aminés après hydrolyse, exprimée en mg/l d'acides aminés.

	Blanc ordinaire B L	Xérès X	Château-Châlon CC 16	Château-Châlon CC 24	Chardonnay B E	Chablis C H	Riesling R	Traminer T R
Alanine	44	21	71	66	48	97	109	189
Valine	41	25	76	46	33	41	93	121
Leucine	57	35	133	77	57	80	137	207
Sérine	28	10	37	33	21	36	55	75
Thréonine	34	20	55	47	27	35	69	119
Sulfoxyde de Méthionine	12	13	—	22	—	35	—	26
Ac. Aspartique	54	24	56	62	32	50	95	84
Ac. glutamique + Glycocolle	126	47	166	160	89	156	208	280
Glutamine	—	10	—	5	—	10	13	34
Lysine	56	22	111	57	39	59	121	240
Arginine	34	13	81	40	16	16	150	150
Histidine	30	7	40	25	15	30	75	150
Phénylalanine	70	—	113	73	—	86	138	207
Tyrosine	27	23	35	28	29	28	75	150
Ac. γ Aminobutyrique						34	25	57
Proline	500	360	1 120	712	1 082	685	690	665
Somme des ac. aminés	1 113	630	2 094	1 453	1 498	1 468	2 053	2 754
Somme des ac. aminés — proline	613	270	974	741	416	783	1 363	2 089

L'arginine a été déterminée de la même manière pour R et TR.

On peut constater que tous les acides aminés habituellement trouvés sont également présents, pratiquement dans tous les vins. Il n'existe pas de différence qualitative significative, mais seulement une différence quantitative.

Les acides aminés libres présents.

— *le glycocolle* est toujours présent, comme on le voit en utilisant le phénol à pH 1 ou le phénol ammoniacal. Cependant, la méthode quantitative ayant été mise au point pour le phénol à pH 4, à ce pH il y a interférence avec l'acide glutamique et la valeur de la tache correspondant

à ces acides aminés a été exprimée en acide glutamique, celui des deux dont la teneur est nettement la plus élevée.

— *l'alanine* est toujours présente, en général en quantité importante. Mais c'est le fait de sa sensibilité à la réaction à la ninhydrine qui l'a fait considérer comme prédominant sur tous les autres. En réalité, les chiffres obtenus sont du même ordre que ceux correspondant aux autres acides aminés ;

— *la valine* est toujours présente, et pourrait cacher une tache due à la méthionine, mais ceci n'est pas le cas en général.

— *la leucine* a toujours été trouvée, en quantité un peu plus forte que la valine. Elle n'a pas été séparée de l'isoleucine ;

— *la sérine* et *la thréonine* sont toujours présentes, en quantité plutôt faible.

— *la méthionine* n'a jamais été décelée par la ninhydrine d'une manière sûre. Cependant on observe, chez R et TR, une tache voisine de la valine qui vraisemblablement correspond à la méthionine, d'autant plus que la présence de cet acide aminé dans ces deux vins est confirmée par la réaction à l'iodoplatinate de potassium. Cependant, une tache correspondant au *sulfoxyde de méthionine* a été observée dans presque tous les cas, malheureusement trop faible pour pouvoir être confirmée par la même réaction sur un chromatogramme à 2 dimensions ; or sur un chromatogramme à 1 dimension elle est masquée par l'histidine qui réagit fortement. La présence de sulfoxyde pourrait être due à l'oxydation de la méthionine pendant les traitements successifs que subissent les échantillons. La méthioninesulfone n'a jamais été caractérisée, la quantité de méthionine-sulfoxyde est trop faible pour que par oxydation selon DENT, par H_2O_2 en présence de molybdate d'ammonium, il se forme une tache définie correspondant au sulfone.

Une tache très peu déplacée, à la fois dans le phénol et dans le butanol acétique, pourrait être l'acide cystéique. Cette tache se retrouve dans tous les vins, qu'ils aient ou non été hydrolysés. L'acide cystéique ne réagissant pas avec l'iodoplatinate de potassium, il n'y a pas non plus de contrôle possible.

— *l'acide aspartique* manquait dans un seul cas (CC 16) ;

— *l'acide glutamique* est toujours en quantité importante ;

— *l'acide γ amino-butyrique* est toujours présent ; dans la plupart des cas, il interférait avec la tyrosine, et la valeur de la tache globale correspondant à ces 2 acides aminés a été exprimée en acide γ amino-butyrique ;

— *l'asparagine* a été mise en évidence dans quelques cas : CC 24, où on trouve une tache jaune assez faible ; R, où elle est en quantité plus importante ;

— *la glutamine* était irrégulièrement présente, dans un seul cas (TR) en grande quantité ; elle ne semble pas être complètement détruite par hydrolyse ;

— *la lysine* a toujours été trouvée, en quantité comparable à l'alanine et la leucine ;

— *l'histidine* n'est pas toujours décelable à la ninhydrine, car elle est masquée par la lysine : mais la réaction à l'acide sulfanilique était toujours positive, d'une manière plus ou moins intense ;

— de même pour *l'arginine*, la réaction de SAKAGUCHI était dans tous les cas positive, quoique parfois très faiblement ;

— *la phénylalanine* a été trouvée dans presque tous les vins étudiés ; sa faible réactivité à la ninhydrine peut la dissimuler, ou tout au moins masquer son importance. Elle est présente en quantités qui peuvent être importantes, comme l'alanine, la leucine et la lysine ;

— *la tyrosine* était souvent masquée par l'acide γ amino-butyrique. Elle n'a pas pu être mise en évidence avec certitude dans tous les vins. On observe cependant dans la plupart des cas une tache fugace par réaction à l'acide sulfanilique.

— *la proline* est de tous les acides aminés celui qui est présent en plus forte quantité, puisqu'il représente parfois plus de la moitié de la totalité. Cependant, si une tache jaune caractéristique et très étendue apparaît toujours à la place de la proline, cette tache devient rapidement gris verdâtre ou violacée, ce qui n'est pas le cas pour les témoins effectués avec une solution pure de proline. De plus, la courbe spectrophotométrique du corps élué dans l'alcool 1/2 ne correspond pas à celle de la proline (DENT), en ce qu'elle présente un maximum à 575 mμ et que la valeur obtenue à 575 mμ est souvent supérieure à celle lue à 440 mμ. Comme la succession des colorations observées est celle décrite par CONSDEN, GORDON et MARTIN (38), pour les peptides dans lesquels le glycocolle présente un groupe aminé libre, il est vraisemblable qu'à la proline se superposent des peptides ainsi constitués.

Pour vérifier cela, nous avons fait un chromatogramme supplémentaire de l'éluat de Traminer ; la zone contenant la proline a été découpée et mise en suspension dans l'eau. La solution a été évaporée à sec, puis hydrolysée dans les mêmes conditions qu'à l'ordinaire, et le résidu hydrolysé, évaporé à sec, a été chromatographié en totalité en 1 dimension. La révélation a montré, outre la tache jaune de proline, plusieurs autres taches, une large zone rougeâtre, mal définie, dont le centre se trouvait avoir un Rf de 0,10, une tache bleutée à Rf 0, 18, et 2 taches mauves de Rf respectivement 0,50 et 0, 66.

D'ailleurs, l'examen des résultats obtenus après hydrolyse montre que la teneur en proline a toujours diminué. Cependant la tache de proline se comporte au point de vue colorimétrique de la même manière

qu'avant hydrolyse. On peut donc supposer que cette hydrolyse est insuffisante pour scinder tous les peptides.

Les résultats donnés par la lecture au photocolorimètre se trouvent donc faussés. Nous avons essayé de doser la proline seule par une méthode colorimétrique sur la solution des acides aminés élués, la méthode de GUEST, dans BLOCK et BOLLING (30). Cette méthode consiste à oxyder la proline par PbO_2 en pyrrol, lui-même réagissant avec la *p*-diméthyl-amino-benzaldéhyde en donnant une coloration rouge. Malheureusement cette méthode ne s'est pas montrée suffisamment précise et nous avons donc pris pour mesure de la proline, la densité optique de la tache éluée dans l'alcool et mesurée à 440 mμ.

Enfin ont été souvent rencontrés :

— la β alanine, en traces dans quelques vins : BL, X, R, TR, surtout après hydrolyse, ce qui prouve qu'elle entre dans la constitution d'un peptide.

— et quelques autres substances réagissant faiblement à la ninhydrine :

— une tache bleue située sous la proline,

— une tache jaune brun, dans la partie du chromatogramme ne renfermant en général pas d'acide aminé (Rf. B. A. :0,500, phénol pH 4 : 0,300) ;

— chez R et TR, une tache sous la leucine, assez importante,

— dans presque tous les échantillons, une tache peu colorée sous la thréonine.

Comparaison avec les données bibliographiques.

Au point de vue qualitatif, ces observations ne constituent qu'une confirmation du fait maintenant bien connu, de la présence de la plupart des acides aminés dans tous les vins. On peut cependant remarquer les faits suivants :

— les acides aminés basiques, lysine, histidine et arginine, ne manquaient dans aucun des vins étudiés, et représentaient même une fraction importante de l'azote aminé ;

— le sulfoxyde de méthionine a été trouvé dans la majorité des cas.

— on a fréquemment rencontré la glutamine, en quantité parfois importante ;

— nous n'avons jamais caractérisé le tryptophane, même dans les chromatogrammes sur lesquels la vérification a été faite au moyen de sa réaction spécifique, par la *p*-diméthyl-amino-benzaldéhyde (Méthode de VOISENET-RHODE, modifiée par THOMAS, dans BLOCK et BOLLING (30).

Au point de vue quantitatif, on remarquera au contraire que les chiffres trouvés sont très différents de ceux indiqués par LÜTHI et VETSCH, excepté pour l'alanine et la thréonine. Ils se rapprochent par contre de

ceux trouvés par CASTOR par dosage microbiologique dans les moûts. Ils sont cependant inférieurs à ceux-ci pour l'acide glutamique, supérieurs en ce qui concerne la lysine et la phénylalanine.

Nous avons de plus constaté que la différence de sensibilité de la réaction à la ninhydrine est telle que l'estimation visuelle ne correspond pas à la teneur réelle, même approximativement. C'est ainsi que la teneur en alanine, considérée comme étant un des acides aminés dominants, se trouve être du même ordre que celle en phénylalanine, qui peut échapper aux recherches par suite de sa faible réactivité et ainsi être considérée comme faisant défaut dans beaucoup de cas. Cependant, cette faible sensibilité entraîne une plus faible précision, en particulier à cause de la valeur non négligeable des témoins, surtout dans les zones du chromatogramme se trouvant près des fronts des solvants ; les erreurs possibles sont donc plus importantes dans ce cas.

Influence de l'hydrolyse.

Si on considère pour chaque vin la somme des acides aminés, sans tenir compte de la proline, on constate dans plusieurs cas (BL, CC 16, CC 24, R) une nette augmentation après hydrolyse. Une différence de 10 p. 100 n'est guère significative, étant donnée la limite de précision de la méthode. Mais on peut constater des variations beaucoup plus importantes, de plus de 30 p. 100 pour BL et CC 16 par exemple. D'autre part, on constate une augmentation importante de la valeur de la tache englobant l'acide glutamique et le glycocolle, et également, quoique d'une manière moins marquée, de la leucine et de la valine.

Par contre, la concordance est bien meilleure en faisant intervenir la proline, du moins dans le cas de BL, CC 16, CC 24 (les valeurs trouvées pour X avant et après hydrolyse concordent entre elles), c'est donc le peptide interférant avec la proline et mesuré avec elle qui est responsable de l'augmentation de l'acide glutamique ou du glycocolle, ce qui est en accord avec les remarques faites plus haut au sujet de la proline. La valeur de la proline diminue en effet sensiblement après hydrolyse dans presque tous les cas, alors que celle des autres acides aminés ne subit pas en général dans ce sens de changement notable.

Dans le cas de TR, très riche en glutamine, l'hydrolyse n'a pas amené d'enrichissement de la tache d'acide glutamique, ce qui fait penser qu'on est peut-être en présence du peptide décrit par DENT sous le nom de « under-alanine » et non de la glutamine.

La diminution observée sur la somme totale : acides aminés + proline, dans le cas de BE, CH et TR, ne s'explique pas bien, mais pourrait être le fait d'une hydrolyse trop poussée qui aurait dégradé certains acides aminés.

Il existe d'ailleurs un autre élément d'incertitude : la présence de peptides qui pourraient être superposés à des taches connues, et ainsi entrer en ligne de compte pour des valeurs très différentes selon l'acide aminé avec lequel ils interfèrent. Par exemple, les peptides superposés à la proline ont été calculés en proline, ce qui ne correspond pas nécessairement à leur courbe d'étalonnage réelle.

Comparaison des vins entre eux.

En ne tenant compte que de la somme des acides aminés libres, on obtient les valeurs suivantes (tableau IV).

TABLEAU IV

	sans proline		avec proline	
	en ac. aminés en mg/l	en N. en mg/l	en ac. aminés en mg/l	en N. en mg/l
X	278	34	723	88
BL	398	54	1063	135
BE	485	65	1735	218
CC 24	585	74	1435	180
CC 16	605	89	1960	254
CH	908	98	1808	208
R	1171	158	1851	241
TR	2445	342	3185	432

Les chiffres obtenus l'ayant été à partir de produit d'origine différente, les vins BE, BL, CH, R et TR étant des vins de la récolte précédente, les autres (X, CC 24, CC 16) étant plus âgés, on voit qu'on ne peut guère déduire de rapport entre l'âge des vins et la teneur en acides aminés. Notre but était d'ailleurs de comparer la richesse des vins vieillis sous voile dans le Jura (CC 16, CC 24) avec les Xérès dont ils se rapprochent au point de vue des procédés de vinification, et quelques vins français.

On constate qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux vins et les deux vins originaires de Bourgogne, traités selon la manière classique (BE, CH). Par contre, ils sont beaucoup moins riches que les vins d'Alsace, surtout le Traminer, mais VALAIZE et DUPONT ont déjà signalé que 2 moûts d'Alsace, le Sylvaner et le Traminer, étaient plus riches que les cépages d'autres régions.

Il est vrai que la fermentation malolactique n'a pas eu lieu dans ces vins, alors qu'elle est terminée dans les autres, du moins X, CC 16, et CC 24.

Une constatation intéressante est le fait que les deux vins du Jura sont beaucoup plus riches que le Xérès, qui pourtant séjourne également longtemps sur lies. Il est vrai qu'on ne peut pas généraliser à partir d'un nombre si faible d'observations.

Nous n'avons pas observé l'enrichissement en valine, leucine et tyrosine constaté par TARANTOLA chez des vins restés sur lies.

IV. — CONCLUSION

On ne constate donc pas de relation entre le bouquet ou le goût des vins jaunes et leur composition en acides aminés, aucune particularité n'apparaissant à l'analyse. On ne peut pas non plus en tirer de conclusion sur la relation entre le développement du voile et la présence ou la teneur en certains de ces corps, les deux échantillons de vin jaune étudiés ne présentant pas d'analogie convaincante entre eux, pas plus en ce qui concerne la somme totale des acides aminés, que pour la proline et l'arginine, auxquels CASTOR et ARCHER attribuent de l'importance dans ce domaine.

Reçu pour publication le 19 *septembre* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) SISSAKYAN (N. M.), BEZINGER (E. N.). — Séparation et détermination des acides aminés du vin, par les méthodes de chromatographie de partage sur papier. *Doklady Akad. Nauk SSSR*, **69**, 573-6, 1949.

(2) SISSAKYAN (N. M.), BEZINGER (E. N.). — Composition des vins en acides aminés. *Biokhim. Vinodeliya, Akad. Nauk SSSR*, Sb. 3, 85-95, 1950.

(3) SISSAKYAN (N. M.). — Problèmes biochimiques posés par le développement d'une base scientifique pour la viticulture. *Biokhim. Vinodeliya, Akad. Nauk SSSR*, Sb.4, 7-31, 1953.

(4). SISSAKYAN (N. M.), BEZINGER (E. N.). — Changement de la composition des acides aminés du vin au premier stade de sa formation. *Biokhimija*, **18**, 4, 412-422, 1953.

(5) BERIDZE (G. I.), BEZINGER (E. N.), SIRBILADZE (M. G.), KUVALVA (E. B.). Changements des acides aminés et des peptides pendant la formation et le vieillissement du vin. *Biokhim. Vinodeliya, Akad. Nauk SSSR*, Sb. 4, 187-210, 1953.

(6) VALAIZE (H.), DUPONT (G.). — Les acides aminés et le bouquet des vins. *Ind. Agr. Alim*, **68**, 5-6, 245-250, 1951.

(7) DUPONT (G.). — Identification des acides aminés du moût de raisin par chromatographie sur papier. *Ann. Techn. Agric.*, Série E., **2**, 95-98, 1953.

(8) LÜTHI (H.) et VETSCH (U.). — Papierchromatographische Bestimmung von Aminosaüren in Weinen. *Schweiz Zeitsch. f. Obst — und Weinbau*, **61**, 390-394, 405-408, 1952.

(9) LÜTHI (H.) et VETSCH (U.). — Papierchromatographische Trennung und Bestimmung von Aminosaüren in Traubenmost und Wein. *Der Deutsche Weinbau, Wiss. Beihefte*, **7**, 3-6, 33-53, 1953.

(10) MC FARREN (E. F.). — Buffered filter paper chromatography of the amino-acids. *Anal. Chem.* **23**, 168-174, 1951.

(11) LÜTHI (H.). — La rétrogradation malolactique dans les vins et les cidres. *Rev. Ferm. et Ind. Alim.* **12**, 1, 15-21, 1957,

(12) HENNIG (K.) et FLINTJE (S. M.). — Papierchromatographische Untersuchung der Zucker, Zuckersaüren und Aminosaüren des Weinen. *Wein. Wiss. Beihefte Deut. Weinbau*, **8**, 121-125, 129-140, 1954.

(13) Almeida (H. de). — Identificacão de amino-acidos no vinho do Porto. *Anais do Instituto do vinho do Porto.* 50 p. 1954.
(14) Tarantola (C.). — Separazione e identificazione cromatografica degli amino acidi nei vini. *Atti acad. Ital. Vite e del Vino,* **6**, 146-157, 1954.
(15) Procopio (M.) et Calè (M. T.). — Les acides aminés libres dans le vin. *VIIe Congrès Int. de la vigne et du vin. B. O. I. V.*, **28**, 295-296, 208-212, 1955.
(16) Dimotakis (P.). — Les acides aminés dans les vins grecs. *Chimica Chronika, Athènes,* **20** A., 10, 1955.
(17) Carballo Caabeiro (J.). — Analisis cromatografico qualitativo de jugos naturales y commerciales de origen vegetal. I-Bebidas fermentadas y mostos. *Anales Invest. Agron.* **5**, 195-210, 1956.
(18) Prillinger (F.). — Uber die stickstoffhältigen Substanzen im Weinen. *Mitteilungen, ser. A.* **7**, 3, 138-147, 1957.
(19) Carles (J.), Lamazou-Betbeder (M.) et Pech (R.), — Les acides aminés libres du vin. *C. R. Acad. Sc.* **246**, 8, 1254-1257, 1958.
(20) Castor (J. G. B.). — The free amino-acids of musts and wines. 1) Microbiological estimation of 14 amino-acids in California grape musts. *Food Research,* **18**, 139-145, 1953.
(21) Castor (J. G. B.), et Archer (T. E.). — Amino-acids in musts and wines, proline, serine and threonine. *Amer, J. Enology,* **7** (1), 19-25, 1956.
(22) Castor (J. G. B.), et Archer (T. E.). — Nutrient requirements for growth of the sherry flor yeast *S. beticus. Applied Microbiology,* **5**, 1, 56-60, 1957.
(23) Dent (C. E.). — A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin reacting substances... *Biochem. J.*, **43**, 169-180, 1948.
(24) Sissakyan (N. M.), Egorov (I. A.), Puchkov (M. G.). — Tryptophane et vitamines du groupe B dans les vins. *Biokhim. Vinodeliya, Akad Nauk SSSR,* Sb. 3, 96-101, 1950.
(25) Hennig (K.) et Oshke. — Bilanz der Stickstoffverbindungen in einen gärenden Most und Jungwein. *Vorratspfl. u. Lebensmittelforsch.*, 5, 408-424. 1942.
(26) Samuelson (O.). — Ions exchangers in analytical chemistry. Almqvist & Viksell, Stockholm. J. Wiley and sons, New York, 1952.
(27) Consden (R.), Gordon (A. H.), Martin (A. J. P.) — Qualitative analysis of proteins : a partition chromatographic method using paper. *Biochem J,* **38**, 224-232, 1944.
(28) Subramanian (N.), Laksminarayan Rao (M. V.), — A simple buffered solvent system for the two - dimensional paper chromatography of amino-acids. *J. Sc. Ind. Res.*, **14**, 56, 1955.
(29) Macpherson (H. T.). — The basic amino-acids content of proteins. *Biochem. J.*, **40**, 470-481, 1946.
(30) Block (R. J.) et Bolling (D.). — The amino-acids composition of proteins and foods : analytical methods and results, second printing. Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1947.
(31) Winegard (H. M.), Toennies (G.), Block (R. J.). — Detection of sulfur containing amino acids on paper chromatograms. *Science,* **108**, 506-507, 1948.
(32) Hawk (P. B.), Oser (B. L.), Summerson (W. H.). — Practical physiological chemistry. 13^e ed. The Blakiston Co. New-York, Toronto, 1954.
(33) Smith (A. M.) et Agiza (A. H.). — The determination of amino-acids colorimetrically by the ninhydrin reaction. *The Analyst,* **76**, 623-627, 1951.
(34) Landua (A. J.) et Awapara (J.). — Use of modified ninhydrin reagent in quantitative determination of amino-acids by paper chromatography. *Science,* **109**, 385, 1949.

(35) Fowden (L.), Penney (J. R.). — Elimination of losses in the quantitative estimation of amino-acids by paper chromatography. *Nature*, **165**, 846-847, 1950.
(36) Thompson (J. F.), Zacharius (R. M.), Steward (F. C.). — Investigations on nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure. *Plant Physiology*, **26**, 2, 375-397, 1951.
(37) Thompson (J. F.), Steward (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. II. Variables in two - dimensional paper chromatography of nitrogen compounds : a quantative procedure. *Plant Physiology*, **26**, 2, 421-440, 1951.
(38) Consden (R.) Gordon (A. H.), Martin (A. J. P.). — The identification of lower peptides in complex mixtures. *Biochem. J.* **41**, 590-596, 1947.
(39) Bobadilla (G. F. de) et Navarro (E.). — Vinos de Jerez — Contribucion al estudio de sus caracteristicas. Analisis de varios tipos de vinos. *Bol. Inst. Nac. Invest. Agr.*, XII, 377-395, 1952.
(40) Muth (F.) et Malsch (L.). — Versuche zur Aufstellung einer Stickstoffbilanz in Traubemosten und weinen. *Z. Untersuch. Lebensm.* **68**, 487-500, 1934.
(41) Amerine (M. A.). — Composition of wines. I. Organic constituants. *Adv. in Food Research*, **5**, 353-510, 1954.
(42) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Analyse et contrôle des vins. Ed. Ch. Béranger, Paris, 1947.
(43) Hennig (K.). — Einige Frage zur Bilanz der Stickstoffverbindungen in Most und Wein. *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.* **87**, 40-48, 1944.
(44) Lederer (E.) et Lederer (M.). — Chromatography. A review of principles and applications. Elsevier Publ. Co. Amsterdam 1954.

LE DÉFERRAGE PARTIEL DES VINS BLANCS PAR LE PHYTATE DE CALCIUM

PAR

M. LÉGLISE et **A. MICHEL**

Station œnologique, Beaune.

Le décret du 20 mai 1955 a autorisé le traitement des vins blancs par le phytate de calcium dans le but d'éliminer l'excès de fer que ceux-ci peuvent contenir et qui les rend sensibles à la casse phosphato-ferrique.

Bien antérieurement à la légalisation de ce nouveau traitement, des études ont été entreprises dans différents pays vinicoles afin de juger de l'intérêt pratique de cette technique et, dans certains cas, de préciser un mode opératoire convenable.

La plupart des œnologues qui ont étudié l'élimination du fer exogène par le phytate de calcium, ont envisagé ce problème sous un angle qui semble en méconnaître certains aspects essentiels.

Après avoir déterminé le rapport expérimental de combinaison de l'acide phytique avec le fer, on en a déduit la quantité de produit commercial à utiliser en relation avec la teneur du vin en fer. Mais sachant que le fer trivalent est seul susceptible de donner une combinaison insoluble avec l'acide phytique, il devient nécessaire de recourir à une oxydation du vin par aération prolongée ou répétée ou encore par oxygénation afin de provoquer la formation du phytate ferrique.

Or, l'oxydation s'est souvent révélée insuffisante pour assurer la transformation intégrale du fer en phytate ferrique et obtenir finalement un vin d'une limpidité stable. Aussi l'application d'une telle technique a-t-elle abouti à de nombreux échecs qui se sont traduits, dans la pratique, par la formation de troubles secondaires aussi graves que ceux contre lesquels on voulait protéger le vin.

L'un de nous avait signalé, dès 1934, que lorsqu'on soumet un vin au contact prolongé de l'air ou à l'oxygénation, on constate qu'une certaine proportion des sels ferreux passe progressivement à l'état ferrique, mais que cette oxydation du fer n'est jamais totale. Il s'établit, entre le

fer réduit et le fer oxydé, un équilibre qui est sous la dépendance de plusieurs facteurs parmi lesquels l'acidité réelle montre une action prépondérante. C'est ainsi que la proportion de fer réduit susceptible de passer à l'état ferrique est d'autant plus élevée que le pH est lui-même plus élevé.

Pratiquement et dans le cas qui nous intéresse, on peut interpréter cette observation en disant qu'il est d'autant plus difficile d'assurer la précipitation intégrale du fer par l'acide phytique que le vin est plus acide.

S'il est évident que l'insolubilisation progressive du fer oxydé provoque une rupture de l'équilibre ferreux $\rightleftarrows$ ferrique avec apparition d'une nouvelle quantité de fer précipitable par l'acide phytique, le terme final de cette oxydation ne peut être atteint que pour autant que le vin renferme encore de l'air ou de l'oxygène dissous.

En conséquence des observations précédentes, il ne faut pas être étonné des résultats peu encourageants obtenus avec le phytate de calcium sur les vins acides qui nécessitent des introductions importantes et renouvelées d'air nuisible à leurs qualités gustatives, et aussi des conclusions pour le moins contradictoires tirées de l'expérimentation, selon que les vins étaient originaires des régions méridionales ou septentrionales.

Si le déferrage des vins blancs acides, souvent anormalement riches en fer, ne nous semble présenter qu'un intérêt relatif, ces vins étant habituellement d'une tenue à l'air satisfaisante, il n'en est plus de même pour ce qui est des vins blancs fins dont l'acidité fixe, après rétrogradation malolactique, est toujours faible. Ces vins constituent, de ce fait, des milieux éminemment oxydables pour lesquels les risques de casse phosphatoferrique sont grands.

Aussi, pour atténuer les inconvénients qui résultent inévitablement d'aérations répétées nécessitées par l'élimination de la totalité du fer au phytate de calcium, devons-nous limiter raisonnablement l'oxydation du fer naturellement réduit lorsque le vin est conservé à l'abri de tout contact avec l'air, à celui correspondant à la seule dissolution de l'air introduit par un simple soutirage. Dans ce cas, le traitement au phytate de calcium ne devra rechercher à éliminer que la fraction du fer oxydé à la suite de ce soutirage.

Cordonnier qui a fort bien résumé les conditions d'emploi du phytate de calcium, a été conduit à adopter une technique de laboratoire dont le principe rappelle celui actuellement utilisé dans la pratique du collage bleu. Détermination par tâtonnement et encadrement de la dose minima mais suffisante de produit déferrant pour éliminer la totalité du fer susceptible de prendre l'état ferrique à la suite d'une aération du vin, c'est-à-dire du fer « cassant ».

Ce procédé empirique peut être amélioré par l'application d'une méthode graphique simple dont nous rapportons, ci-dessous, le mode opératoire.

Malgré la faible solubilité du phytate de calcium dans le vin (8 à 10 g/l dans la gamme habituelle des acidités) il importe, tant pour les essais préliminaires que pour le traitement proprement dit, de ne travailler qu'avec un produit en solution. Si le phytate est introduit dans le vin sous forme pulvérulente, il a tendance à tomber au fond des récipients sans avoir eu la possibilité de se dissoudre. Il est alors sans efficacité.

Pour les essais, on aura recours à une solution citrique, excellent dissolvant du phytate de calcium qui ne s'oppose pas à la précipitation du phytate ferrique.

Pour le traitement proprement dit, le phytate de calcium sera dissous au préalable dans du vin à traiter.

Étude graphique du rapport de combinaison phytate/fer.

Les échantillons de phytate de calcium actuellement dans le commerce sont de pureté variable. Leur combinaison quantitative avec le fer oxydé varie d'un échantillon à l'autre, mais chacun de ces produits se comporte, dans des conditions bien définies, d'une façon sensiblement constante.

Pour une variété de phytate donnée, il importe donc de connaître tout d'abord son rapport optimum de combinaison avec le fer ferrique.

On sait que si l'on introduit dans un vin une dose de phytate supérieure à celle nécessaire à l'élimination du fer ferrique, on entraîne relativement davantage de fer, quelques milligrammes de fer réduit pouvant s'oxyder. Dans ce cas, le rapport de combinaison est modifié, mais l'excès de phytate de calcium resté en solution dans le vin provoquera un nouveau trouble phytatoferrique à la première aération.

Si, au contraire, on traite le vin par une dose de phytate inférieure au fer existant à l'état oxydé, on n'élimine pas la totalité de ce fer et on risque une casse phosphatoferrique.

Mais dans tous les cas, *il existe une proportion exacte pour laquelle la totalité du fer ferrique est précipitée par la totalité du phytate ajouté.*

Pour déterminer, pour chaque variété de phytate de calcium, ce rapport optimum, on peut procéder comme suit :

Matériel : une série de tubes à essais de 25 ml environ.

Solutions : *a*) Solution de phytate. Peser exactement 200 mg de phytate de calcium, puis 300 à 400 mg d'acide citrique. Faire dissoudre les deux produits mélangés, en présence d'eau distillée, dans une fiole jaugée de 100 ml. Compléter au trait.

Une telle solution permet d'utiliser 0,2 mg de phytate avec une précision suffisante.

b) Suspension de bentonite à 5 p. 100.

Vins à utiliser : Pour ces déterminations préliminaires, on choisit, de préférence, des vins de faible acidité et renfermant de 20 à 35 mg de fer.

Il conviendra de répéter l'expérience sur plusieurs vins d'origine et de caractères différents pour s'assurer de la constance de comportement du phytate étudié.

Essais de laboratoire

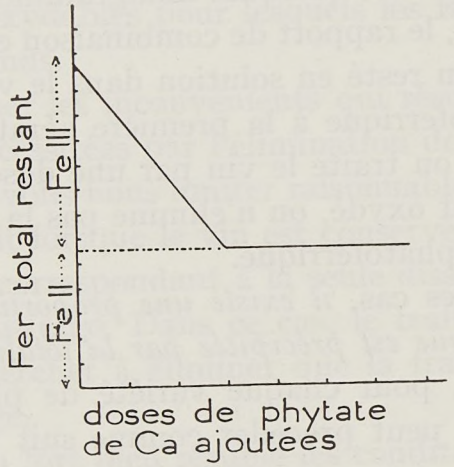
Le vin utilisé pour l'essai sera d'abord aéré à saturation par agitation énergique avec un égal volume d'air pendant une minute.

Après un repos de 4 jours à l'abri de la lumière, on titrera, par la méthode colorimétrique au sulfocyanure, le fer ferrique qui, à ce moment, a atteint son maximum, ainsi que le fer total.

Dans une série de tubes à essais renfermant 10 ou mieux 20 ml du vin aéré, on ajoutera des volumes croissants de la solution citrique de phytate représentant des doses respectivement égales à 3, 4, 5, ... 8,9 et 10 fois le poids de fer ferrique à éliminer.

La floculation du phytate ferrique est complète après 6 heures et sa chute commence. On peut alors, soit attendre 24 heures que la chute du précipité soit complète, soit l'accélérer en ajoutant à chaque tube une ou deux gouttes de suspension de bentonite et en agitant.

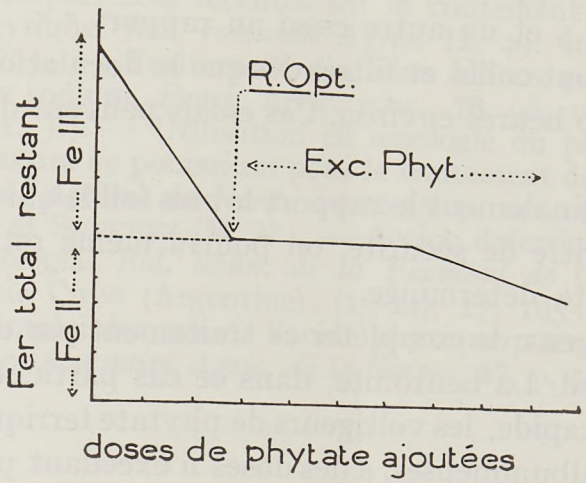
Le vin de chaque tube est alors filtré et on titre sur chaque filtrat la dose de fer total restant.



On porte alors sur un graphique rectangulaire les doses de fer restant en fonction des quantités de phytate de calcium ajoutées.

Théoriquement, on doit obtenir une branche rectiligne descendante à laquelle fait suite un palier horizontal correspondant à l'élimination totale du fer ferrique et à la dose de fer réduit restant.

Dans la pratique, ce palier existe mais il est suivi d'une seconde branche descendante correspondant à une combinaison phytate/fer différente du rapport optimum et, en tout cas, à un excès de phytate dissous dans le milieu.



R. Opt. = point de rapport optimum
Exc. Phyt. = excès de phytate.

On prendra comme rapport optimum le point d'intersection entre la branche descendante et le palier.

Ce rapport étant déterminé pour un phytate donné, il suffira de le vérifier par encadrement toutes les fois qu'on effectuera un traitement avec le même produit.

Pour la variété chimiquement pure de phytate de calcium CYBA, nous avons trouvé un rapport optimum phytate/fer égal à 5 avec de très rares variations comprises entre 4,5 et 5,5.

Avec les variétés Aferrin et Société du Maïs, qui renferment un léger insoluble organique non-phytate et dont le taux d'humidité est variable, ce rapport a varié entre 5,5 et 6.

Traitement du vin.

Le vin sera soutiré à l'air et laissé au repos durant 4 jours. Ce temps est absolument nécessaire à l'établissement de l'équilibre de la phase oxydée. Une aération préalable est toujours indispensable pour obtenir une bonne floculation du phytate ferrique. Avec les vins qui présentent des doses sensibles de fer ferrique mais traités sans aération préalable, la floculation et la sédimentation du phytate ferrique s'effectuent mal et incomplètement.

Pour préserver les qualités des vins des inconvénients pouvant résulter de cette aération, il suffira de les sulfiter légèrement à la dose de 3 à 5 g/hl. A cette concentration, l'anhydride sulfureux ne s'oppose pratiquement pas à l'oxydation du fer et le vin est ainsi protégé de tout risque de jaunissement ou de madérisation.

Le quatrième jour, on titera Fe III et on vérifiera par un essai rapide sur 100 ml la dose utile de phytate de calcium à utiliser.

Connaissant le rapport optimum, on procédera à trois essais. Par exemple, pour un rapport phytate/fer = 5, on effectuera également un essai au rapport 4,5 et un autre essai au rapport 5,5.

Les essais seront collés et filtrés dès que la floculation sera apparente, c'est-à-dire après 6 heures environ. Ces essais peuvent donc être effectués dans la journée.

On adoptera finalement le rapport le plus faible qui élimine la totalité du fer oxydé. A titre de sécurité, on pourra même retrancher 1 g/hl de la dose de phytate déterminée.

Il est avantageux de compléter ce traitement par un collage effectué 24 heures plus tard. La bentonite, dans ce cas particulier, ne donne pas une clarification rapide, les voltigeurs de phytate ferrique s'opposant à sa chute. Les colles albumineuses, à des doses n'excédant pas 5 g/hl donnent de bons résultats

Une filtration pourra être pratiquée dès que le gros de la colle sera tombé. Enfin, par mesure de sécurité et aussi comme test de l'efficacité du traitement, on pourra laisser le vin au repos durant quelques jours.

En résumé, cette méthode permet l'élimination totale du fer oxydable en évitant strictement tout excès de phytate de calcium qui, en restant dissous, nuirait à la limpidité ultérieure du vin.

Reçu pour publication le 17 octobre 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Ferre (L.) et Michel (A.). — Contribution à l'étude de la casse blanche. *Ann. Fals. et Fraudes*, 197-210, 1934.

(2) Guillemet (R.). — L'acide phytique. Étude biochimique et physiologique. *Biol. Medic.* **35**, n° 4, 5 et 6. 1946.

(3) Cordonnier (R.). — Étude de l'élimination du fer des vins blancs par le phytate de calcium. *Annales Fals. et Fraudes*, **44**, 415. 1952.

(4) Negre (E.) et Cordonnier (R.). — Ferrocyanure de potassium et phytate de calcium. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **38**, 346. 1952.

(5) Ribereau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — Emploi du phytate de calcium dans les vins comme agent déferrant. *Indust. agric. et aliment*, **70**, 129, 1953.

(6) Barre (R.), Courtois (J. E.) et Wormser (G.). — Étude de la structure de l'acide phytique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, p. 457, 1954.

(7) Capt (E). — La casse blanche des vins et son traitement aux sels de l'acide phytique. *Rev. romande Agric.*, **10**, 39, 1954.

(8) Capt (E.). — L'emploi des phytates pour éliminer les excès de fer des vins. *Rev. romande Agric.* **10**, 49. 1954.

(9) Freyre Nieto (E.). — Application du phytate de calcium à la clarification et à la stabilisation des vins de Xérès. Bull. I. N. R. A. Espagne, déc. 1954.

(10) GARINO-CANINA (E.) et SUDARIO (E.). — I sali dell'acido meso-inosite-safosforico come deferrizzanti. *Italia vinicol. ed agrar*, **44**, 230 et 258, 1954.
(11) HENNIG (K.). — Aferrin als Ersatz del Blauschönung. Das Weinblatt, **48**, 552, 1954.
(12) CAPT (E.). — Expériences récentes sur le traitement des vins aux sels de l'acide phytique. *Rev. romande Agric.* **11**, 49. 1955.
(13) CORDONNIER (R.). — Traitement des vins blancs par les phytates de calcium et de sodium. *Progr. agric. vitic.*, **76**, 98, 1955.
(14) COURTOISIER (A. J.). — Utilisation en œnologie du phytate de calcium et du ferrocyanure de potassium pour le traitement des casses ferriques. *Rev. Agric. de l'Afrique du Nord.*, 14-10-55, p. 242-246.
(15) MAVEROFF (A.) et SANCHEZ (M. N.). — Accion deferrizante del Fitato de calcio en Enologia. *Bol. techn. de la Facultad de Ciencias Agrarias.* Universidad de Cuyo (Argentine). (13-14), 17, 1955.
(16) CAPT (E.). — Emploi des sels de l'acide phytique pour éliminer les excès de fer des vins. *Annuaire Agric. de la Suisse*, **57**, p. 561-572, 1956.

DÉTERMINATION DE L'ACIDE l-MALIQUE DANS LES BOISSONS FERMENTÉES PAR DÉCARBOXYLATION ENZYMATIQUE

PAR

R. ROSSET et P. DUPUY

Station de Technologie végétale, Versailles.

L'acide l-malique est un constituant largement répandu chez les végétaux. C'est un métabolite normal de la cellule que l'on trouve à des concentrations élevées dans beaucoup de fruits. Son importance est donc primordiale, dans la constitution des jus de fruits et des boissons qui en dérivent par fermentation. Les variations sont importantes au cours de la maturation des fruits, et comme il est facilement métabolisable par les microorganismes, il peut disparaître dans les vins, les cidres ou les jus de fruits.

On se trouve donc souvent amené à entreprendre des dosages d'acide malique dans les végétaux ou les produits qui en dérivent. On peut alors choisir entre diverses méthodes chimiques utilisant des propriétés non spécifiques, l'acidimétrie, l'oxydation permanganique ou la colorimétrie. Au préalable, il est nécessaire d'éliminer les substances qui risqueraient d'introduire une erreur dans le dosage, ce qui amène à faire des séparations sur échangeurs d'ions ou des précipitations. Dans le cas des vins par exemple, la méthode la plus utilisée consiste à précipiter les sels de baryum des acides organiques dans l'alcool à 66° puis à effectuer une oxydation permanganique. Le résultat final est obtenu après une correction tenant compte des acides citrique et tartrique qui ont aussi participé à l'oxydation. Les méthodes chimiques proposées sont donc laborieuses et parfois peu précises parce qu'elles utilisent des réactions non spécifiques.

Or pour l'acide malique nous disposons d'une réaction enzymatique qui se prête fort bien à un dosage. En effet, sous l'action de l'enzyme malique, l'acide malique est décarboxylé, libérant ainsi du gaz carbo-

nique qui peut être déterminé manométriquement dans l'appareil de WARBURG. Cette réaction est spécifique ; elle rend donc inutile toute purification dans l'échantillon. Elle permet de plus, de bénéficier de tous les avantages d'une microméthode. Dans ce cas particulier, il n'est même pas nécessaire de purifier l'enzyme malique. Comme c'est un enzyme adaptatif, il est possible d'obtenir des bactéries adaptées à la décarboxylation de ce seul acide et ne possédant aucune autre propriété gênante dans le dosage.

Dans le cas du dosage dans le vin, RENTSCHLER (10) a déjà utilisé la décarboxylation de l'acide l-malique par *Bacterium gracile*. Cette méthode présente des inconvénients, d'abord parce que *Bacterium gracile* est difficile à cultiver et ensuite parce que l'appareillage manométrique particulier à ce dosage est peu susceptible d'autres utilisations.

D'autre part, OCHOA (1 à 6) et NOSSAL (8-9) ont proposé sur le même principe des micro-méthodes qui, à notre connaissance, n'ont jamais été appliquées au vin. Ils mesuraient la décarboxylation dans l'appareillage de WARBURG, par une suspension de *Lactobacillus arabinosus* adapté à l'utilisation de l'acide malique.

Le présent travail a pour but d'appliquer cette technique au cas des vins, cidres et jus de fruits. Comme on a utilisé une souche de Lactobacille dont la culture est particulièrement facile et qui diffère de celle utilisée par OCHOA et NOSSAL, on a été amené à préciser quelles étaient les conditions optima pour la culture, la formation de l'enzyme malique, et l'utilisation des bactéries non proliférantes.

A. — MÉTHODES

1° Méthodes de mesure utilisées.

— *Croissance* : on utilise la mesure de la turbidimétrie des suspensions ; on lit la correspondance en poids sec sur une courbe ;

— *Adaptation* : nous mesurons la quantité d'enzyme apparue par la méthode manométrique de WARBURG : température 38°, tampon acétate O, 1M ; (volume de liquide 2 ou 3 ml), — atmosphère air ou CO_2 (5 p. 100 N_2 (95 p. 100), — nous l'exprimons par le CO^3 dégagé en μl par minute, par mg de poids sec de bactéries.

2° Méthodes de culture utilisées.

— *Souche* : *Lactobacillus arabinosus*.

— *Entretien* : par culture sur milieu simple contenant : glucose : 1 p. 100, acide dl-malique : 1 p. 100, extrait de levure (Yeast Extract Difco) : 1 p. 100, ajusté à pH 6,8 ; stérilisé 20 minutes à 110°.

— *Adaptation* : en flacons de 150 ml contenant 100 ml du milieu par litre : glucose 20 g, acide dl-malique 20 g, extrait de levure (Yeast Extract Difco) 10 g, extrait de bouillon de bœuf (Beef Extract Difco) 3 g, hydrolysat tryptique de caseine (Bactotryptone Difco) 5 g, acétate de Na, 3 OH_2, 10 g, PO_4H_2 K1 g, solution de sels minéraux de WRIGHT et SKEGG 5 ml (solution B), Biotine 5 µg. On ajuste le pH à 4,2, on chauffe à 110°, on filtre, on répartit et on stérilise 20 minutes à 110°. On ensemence avec des cultures de 24 heures.

— *Récolte* : par centrifugation. Après deux lavages on remet en suspension dans le tampon phosphate 0,067 M à pH 7, de façon à avoir une suspension contenant environ 10 mg/ml.

— *Décarboxylation* : à pH 4,8, Tampon acétate (acide acétique 0,2 M : 40 ml, acétate de sodium 0,2 M : 60 ml, Cl_2Mn4OH_2. : 0,08 g, glucose 0,4 g) : 1,5 ml. Suspension bactérienne (15 mg/ml dans PO_4H_2K : 0,067 M) 0,5 ml. Solution d'acide malique : 1 ml (dans le diverticule).

— *Purification de l'acide malique* :

Nous avons purifié l'acide malique du commerce par chromatographie sur papier ; nous avons ensuite élué, dans de l'eau bidistillée et bouillie, la zone où avait migré l'acide malique.

Notons que nous avons utilisé couramment l'acide dl-malique (l'acide d-malique n'étant pas métabolisé).

B. — RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMA

1° Culture d'entretien sur milieu simple.

pH du milieu d'entretien.

1° Nous avons réalisé deux gammes de cultures d'entretien à différents pH. Nous les avons ensemencées à partir de culture à pH 3,5 et à pH 6,8.

TABLEAU I

pH du milieu d'entretien.

pH du milieu	Croissance dans un milieu ensemencé à partir d'une préculture	
	à pH 6,8 (1)	à pH 3,5 (2)
3,5	0,23	0,08
3,8	0,27	0,11
4,1	0,33	0,15
4,4	0,48	0,26
5	0,86	0,49
5,3	1,03	0,56
5,6	1,06	0,61
6	1,09	0,64
6,8	1,1	0,65

Croissance exprimée en mg/ml (au bout de 72 heures) — température 30° — milieu : le milieu simple contenant de l'acétate de Na (10 g/l) et ajusté au pH par l'acide acétique 2 N.

L'interprétation du tableau I semble donc prouver que cette souche de *Lactobacillus arabinosus* ne s'adapte pas à des pH bas (pH 3,5 par exemple) par culture préalable à ce pH, mais qu'au contraire sa vitalité est diminuée par une telle culture préalable. Nous aurons donc intérêt à utiliser comme pH du milieu d'entretien des pH voisins de pH 6.

2° Durée de conservation en préculture.

Nous avons ensemencé une gamme du même milieu à différents pH et nous avons étudié la durée de conservation de la souche ainsi entretenue en ensemençant chaque semaine une série de tubes contenant du milieu d'entretien à pH 6,8.

TABLEAU II

Durée de conservation des précultures.

pH d'entretien	Croissance après :			
	1 semaine	2 semaines	5 semaines	12 semaines
3,5	1,16	1,50	0,12	0
3,8	1,38	1,50	0,12	0
4,1	1,38	1,49	0,09	0
4,4	1,45	1,49	0,11	0
4,7	1,44	1,50	0,12	0
5	1,44	1,54	0,12	0
5,3	1,44	1,50	0,16	0,1
5,6	1,44	1,49	0,19	0,12
6	1,47	1,50	0,39	0,32
6,8	1,54	1,54	0,51	0,41

Croissance exprimée en mg/ml après 72 heures d'incubation, — température 30°.

D'après le tableau II, il semble que pH 6,8 indiqué par OCHOA est préférable à des pH plus bas pour les cultures d'entretien. Nous n'avons pas utilisé de pH plus élevé, l'optimum de croissance du microorganisme, nous le verrons, étant voisin de 5,5. D'autre part, nous pouvons signaler qu'il n'est pas indispensable d'utiliser pour l'ensemencement des milieux de culture, des précultures de 24 heures.

Dès à présent, nous notons la rusticité du germe utilisé : sa vitalité est bonne même après une conservation de longue durée ; par conséquent nous pouvons éviter des repiquages fréquents. Il suffit d'avoir quelques tubes de préculture à pH 6,8 — âgées de 1 à 15 jours, qu'on utilisera pour les ensemencements.

II. — Adaptation.

1° Action du pH

Nous avons ensemencé une série de flacons contenant le milieu complet mais à différents pH ; nous avons suivi la croissance et l'adaptation des germes.

Il apparaît (fig. 1) que la quantité maximum d'enzyme est obtenue vers pH 4,2. C'est cette valeur que nous avons retenue.

Les optima sont assez étroits, on conçoit dans ces conditions que le

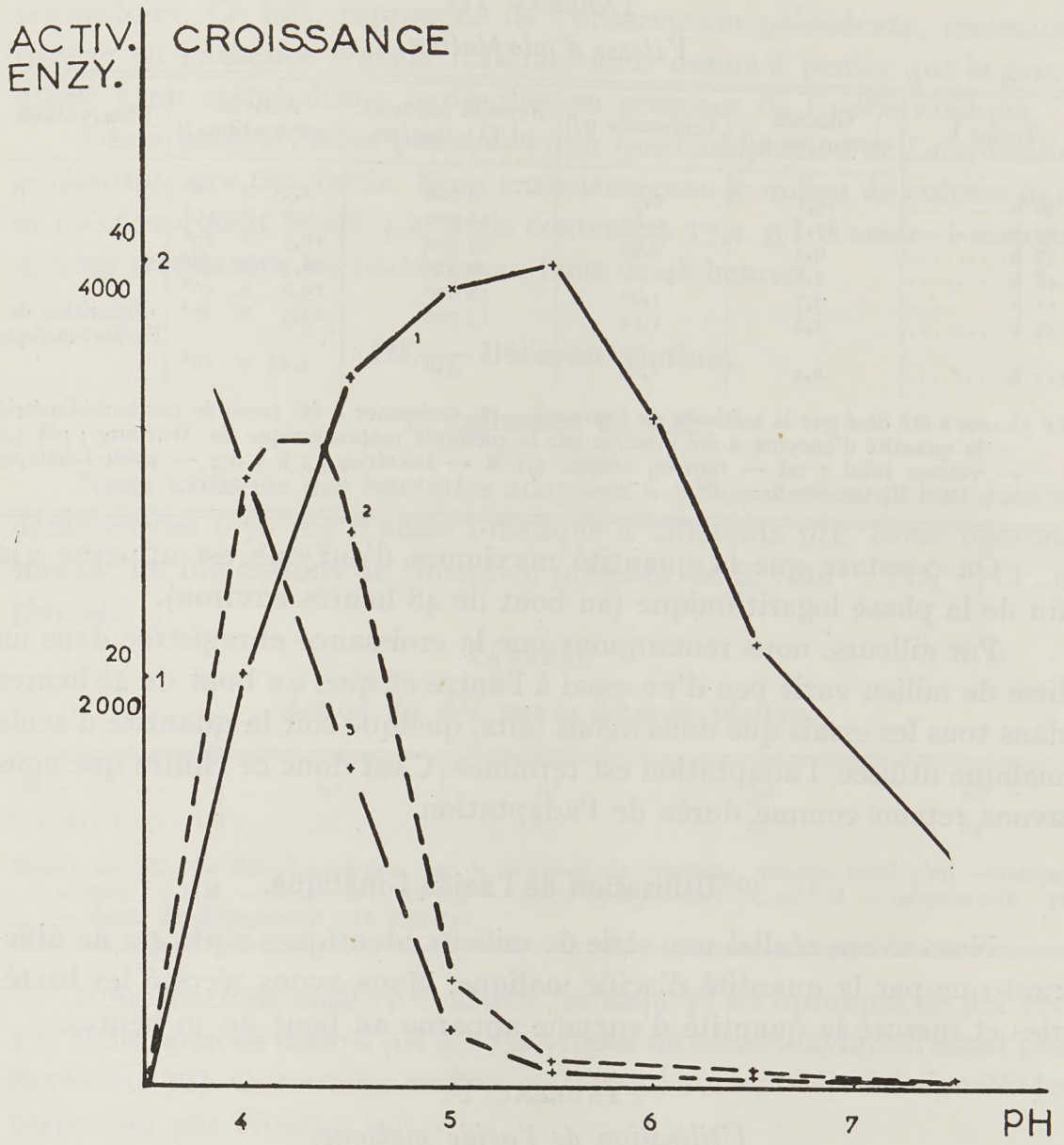


FIG. 1. — La croissance est mesurée par turbidimétrie et exprimée en mg/ml (courbe 1).

L'activité enzymatique est mesurée par le volume de CO_2 dégagé par décarboxylation de l'acide l-malique au Warburg (volume total : 3 ml — tampon acétate pH 4, 8, 0, 1 M — bactéries 2 à 4 mg. — acide malique : 0,22 10^{-2}M — température 38°. Courbe 2 : activité enzymatique exprimée en µl de CO_2 dégagé par minute et par mg de bactéries. Courbe 3 : activité enzymatique par litre de milieu.

Les 2 derniers points correspondent à des milieux tamponnés par un tampon phosphate.

milieu doit être bien tamponné (ce qui est le cas ici, le pH varie de 0,2 unités au cours de l'adaptation).

Nous devons noter qu'en l'absence d'acide malique, la croissance dans le même milieu, est réduite.

2° Vitesse de l'adaptation.

Nous avons suivi l'adaptation des microorganismes à pH 4,2 en présence d'acide dl-malique (20 g) et de glucose (15 g).

TABLEAU III

Vitesse d'adaptation.

Temps h.	Glucose restant en g/l	Croissance g/l	Activité enyzmat. µl/CO_2/mg/mn	Activité enzymatique/l	Observations
36 h.	13,1	0,5	8 700	$4{,}35 \times 10^6$	
39 h.	11,3	0,61	15 900	$9{,}6 \times 10^6$	
45 h.	9,4	0,92	20 400	$18{,}7 \times 10^6$	
48 h.	7,8	1	20 300	$20{,}3 \times 10^6$	
51 h.	7,7	1,05	18 600	$19{,}6 \times 10^6$	
54 h.	1,4	1,12	13 700	$15{,}3 \times 10^6$	disparition de l'acide l-malique
112 h.	0,4	1,24	348	$4{,}25 \times 10^6$	

Le glucose a été dosé par la méthode de Bertrand — la croissance a été mesurée par turbidimétrie — la quantité d'enzyme a été mesurée par la méthode manométrique de Warburg ; pH 4,8 — volume total 3 ml — tampon acétate 0,1 M — bactéries : 2 à 4 mg — acide l-malique $0{,}22\ 10^{-2}$ M, température 38°

On constate que la quantité maximum d'enzyme est apparue à la fin de la phase logarithmique (au bout de 48 heures environ).

Par ailleurs, nous remarquons que la croissance enregistrée dans un litre de milieu varie peu d'un essai à l'autre et que, au bout de 48 heures dans tous les essais que nous avons faits, quelque soit la quantité d'acide malique utilisée, l'adaptation est terminée. C'est donc ce chiffre que nous avons retenu comme durée de l'adaptation.

3° Utilisation de l'acide l-malique.

Nous avons réalisé une série de milieux identiques à pH 4,2 ne différant que par la quantité d'acide malique. Nous avons récolté les bactéries et mesuré la quantité d'enzyme apparue au bout de 36 heures.

TABLEAU IV

Utilisation de l'acide malique.

Acide l-malique		Croissance g/l	Enzyme µl/CO_2/mg/mn	Enzyme par litre
Avant g/l	Après 36 h. g/l			
2,2	0,4	1,27	2,1	2 600
5,1	0,8	1,47	3,2	4 600
8,8	1	1,34	3,6	4 800
13.6	1	1,3	4,8	6 280
17,6	1,3	1,07	4,8	5 100

Dosage de l'acide l-malique par la méthode de Warburg, (volume total 2 ml) — tampon pH 4,8 (acétate 0,1 M) — température 38° — atmosphère CO_2 5 % N_2 95 %. Mesure de la croissance par turbidimétrie. Mesure de la quantité d'enzyme d'après la vitesse de décarboxylation de l'acide l-malique (volume total 3 ml) — tampon pH 4,8 (acétate 0,1 M) — acide malique $0{,}22 \times 10^{-2}$ M — bactéries 2 à 4 mg — température 38°

Nous voyons (tableau IV) que la quantité maximum d'enzyme apparue dans le milieu correspond sensiblement à 0,1 M d'acide l-malique par litre comme l'avait signalé Nossal (9).

Nous devons signaler que parallèlement à l'augmentation de la quantité d'enzyme apparue, on peut noter une baisse régulière de l'intensité respiratoire. Ce fait, rapproché de l'observation précédente, croissance réduite en l'absence d'acide malique, nous donne à penser que le germe utilisé a un métabolisme particulier en présence de l'acide malique.

Dès à présent, nous pouvons noter que l'adaptation de *Lactobacillus arabinosus* sera très facile. Nous ensemencerons le milieu de culture défini précédemment à pH 4,2, mais contenant 13,4 g/l d'acide l-malique et nous récolterons les bactéries au bout de 48 heures.

III. — Décarboxylation.

1° Influence du pH.

Nous utilisons des bactéries adaptées à pH 4, 1 et nous leur faisons décarboxyler 0,70 mg d'acide l-malique à différents pH. Nous opérons, suivant les indications de Nossal en présence de K^+, Mn^{++}, PO_4^{---}, Cl^-, et glucose.

Tableau V

Action du pH sur la décarboxylation.

pH	4,4	4,8	5,2	5,6
CO_2 en µl.....	31	67	27	23

Mesure du CO_2 de décarboxylation par la méthode de Warburg, volume total 3 ml — tampon acétate : 0,1 M — bactéries : 1,2 mg — acfde malique 0,17 × 10^{-2} M — température : 38° — durée du dégagement : 18 minutes

Nous mettons ainsi en évidence (tableau V) un optimum de pH vers 4,8. Nous opérons donc à pH 4,8 : la vitesse de décarboxylation étant plus élevée à ce pH. Ce sont des chiffres voisins qui avaient déjà été signalés (en particulier par Nossal (9)).

2° Influence de l'alcool et du sulfite.

Nous opérons à pH 4,8 dans les mêmes conditions que précédemment Nous utilisons un vin ayant subi la fermentation malo-lactique ; une partie de ce vin a été désalcoolisée par ébullition ; ensuite, une partie de ce vin a été traitée après ébullition par une solution de sulfite à raison de 300 mg/l en SO_2.

Les chiffres du tableau VI montrent que nous aurons intérêt à opérer sur des échantillons désalcoolisés et désulfités, sans que cela soit indispensable. Cela nous permet de réduire la durée de la décarboxylation.

TABLEAU VI

Action de l'alcool et des sulfites.

Temps en minutes	µl CO_2 dégagé			
	Vin	Vin bouilli	Vin bouilli sulfité	Eau
3	3,5	6	6	—
13	11	22	17	—
18	14	31	22	—
23	17	35	27	—
43	22	53	41	104
58	33	70	47	—
78	45	81	63	—
88	47	86	69	—
113	72	94	86	105

Mesure du CO_2 de décarboxylation par la méthode de Warburg. Volume total : 3 ml — tampon acétate pH 4,8 : 0,1 M — bactéries : 3,6 mg, acide malique : 0,17 × 10^{-2} M — vin : 0,5 ml — température : 38°

3° Respiration des bactéries.

Nous avons mesuré la respiration des bactéries en présence de glucose à pH 4,8 à 38° (conditions retenues pour la décarboxylation). Elle est suffisamment importante pour perturber les mesures de CO_2 provenant de la décarboxylation de l'acide l-malique.

Nous avions pensé l'inhiber de l'azide par sodium mais en vain.

TABLEAU VII

Influence de la respiration.

	Bactéries sans N_3Na			Bactéries en présence de N_3Na		
	O_2	CO_2	O_2/CO_2	O_2	CO_2	O_2/CO_2
µl/mg/heure	5,5	7,1	0,78	1,8	2,9	0,62

Volume total : 2 ml — tampon acétate 0,1 N — suspension de bactéries de 5 jours : 6,7 mg — N_3Na : 2.10^{-2} M, glucose : 0,01 M — température: 38°

Nous avons opéré en présence du mélange gazeux N_2 : 95 p. 100, CO_2 : 5 p. 100. Dans ces conditions, la consommation d'oxygène est arrêtée et il n'y a pas de dégagement de CO_2 par respiration.

C. — RÉSULTATS

1° Spécificité de la méthode.

Des vins et des cidres ayant subi la fermentation malolactique ne donnent pas de dégagement de CO_2 appréciable. Nous en concluons que les substances pouvant interférer comme l'acide pyruvique, l'acide fumarique ne risquent pas de perturber le dosage.

2° Précision des résultats.

Nous avons purifié l'acide malique du commerce et nous avons dosé l'acide malique contenu dans la solution par acidimétrie, par pesée, par oxydation permanganique ; la solution que nous avons utilisée contient 1,1 mg par ml d'acide l-malique (qui par décarboxylation enzymatique, donne un dégagement de 182 µl de CO_2).

Nous avons fait deux types de mesure.

a) *Dosage manométrique de l'acide l-malique de la solution.*

Nous avons mesuré le CO_2 de décarboxylation, dégagé en une heure à partir de l'acide l-malique en quantité connue (0,5 ml correspondent à 91 µl).

Nous obtenons une bonne vérification des résultats donnés par les autres méthodes. La durée de décarboxylation doit être de 45 minutes au moins (tableau VIII). La précision que l'on peut attendre de cette méthode est de l'ordre de 2 p. 100.

Tableau VIII

Dosage de l'acide malique.

Temps en minutes	CO_2 dégagé en µl	
7	62	54
14	75	67
21	83	79
28	87	85
37	90	88
50	91	90
60	91	90

pH : 4,8 (tampon acétate 0,1 M, Bactéries : 6,7 mg — acide malique : 2×10^{-3} M (représentant 91 de CO_2) — glucose : 0,01 M — PO_4H_2K : 0,033 M — Cl_2 Mn : $2\ 10^{-3}$ M, température : 38° — atmosphère : CO_2 5 %, N_2 : 95 %

b) *Dosage de l'acide l-malique d'un cidre dilué au 1/4.*

Nous mesurons comme précédemment le CO_2 dégagé à partir de l'acide malique contenu dans 0,5 ml de cidre dilué au quart (37 µl) ; puis nous mesurons le CO_2 dégagé à partir de 0,5 ml de cidre dilué au quart de 0,5 ml de solution d'acide l-malique (91 γl) (tableau IX). Le CO_2 total dégagé correspond bien à la somme des deux.

Tableau IX

Dosage de l'acide l-malique.

Temps en minutes	CO_2 dégagé en (1)	(2)	(3)
7	18	9	35
17	68	22	85
27	82	38	110
37	92	37	128
49	92	37	130

pH : 4,8 — volume total : 3 ml — tampon acétate : 0,1 M — bactéries 6 mg (1) acide malique 2×10^{-3} M correspondant à 91 (2) cidre dilué au quart : 0,5 ml, + eau : 0,5 ml (3) cidre : 0,5 ml + acide malique 0,2 $\times 10^{-2}$ M, glucose :0,01 M — PO_4H_2K : 0,033 M — Cl_2 Mn : 2×10^{-3} M — température : 38° — atmosphère : CO_2 : 5 %, N_2 95 %

Ces résultats permettent de conclure que l'utilisation de cette méthode est possible au laboratoire.

3° Limites.

Nous mesurons des dégagements gazeux compris entre 1 et 150 µl pratiquement le chiffre retenu est compris entre 50 et 130 µl ce qui correspond sensiblement à des limites de 0,3 mg et 0,7 mg d'acide l-malique, dans la prise d'essai.

D. — MÉTHODE DE DOSAGE

Les résultats précédents nous conduisent à utiliser la méthode suivante :

1° *Entretien* sur milieu simple ajusté à pH 6,8 : glucose 1 p. 100, acide dl-malique : 1 p. 100, Yeast extract Difco, 1 p. 100.

2° *Adaptation* sur milieu ajusté à pH 4,2 par NaOH 5 N : glucose 20 g, acide dl-malique 27, g, yeast extract Difco 10 g, beef extract Difco 3 g, bactotryptone Difco 5 g, acétate de sodium, 3 OH_2 : 10 g, PO_4H_2K : 1 g, solution saline de Wright et Skegg (SH_4Mg $7OH_2$ 40 g, SO_4Mn $4OH_2$ 2 g, Cl_3Fe anhydre, 0,4 g, 20 gouttes ClH pur par l) : 5 ml, durée de l'adaptation 48 heures à 30 °. La biotine ne s'est pas montrée utile : nous l'avons supprimée.

3° Décarboxylation

a) Récolte des bactéries par centrifugation, suivie de deux lavages à l'eau distillée.

b) Mise en suspension dans le tampon phosphate à pH 7, 0,067 M, (suspension à environ 10 mg/ml), l'activité enzymatique d'une telle suspension subsiste pendant environ 5 semaines.

c) Mesure manométrique. On met : *dans la cupule*, volume total du liquide : 1,5 ml, tampon acétate pH 4,8 : 1 ml (pour 100 ml : acide acétique, 0 2 M : 40 ml, acétate de Na, 0,2 M : 60 ml, glucose : 0,4 g, Cl_2Mn $4OH_2$: 0,08 g), suspension de bactéries : 0,5 ml (dans le tampon phosphate), *dans le diverticule*, solution à analyser à pH 5 : 0,5 ml. Nous évitons grâce à cette répartition, les erreurs dues à la rétention de CO_2. Température : 38°, atmosphère : CO_2 : 5 p. 100, N_2 : 95 p. 100.

Lorsque la température est équilibrée, on renverse les fioles et au bout de 45 minutes, on fait la mesure.

Remarque : Pour un cidre ou un vin n'ayant pas subi la fermentation malique, on dilue normalement 4 fois la solution à analyser.

4° *Résultats* : 1 µl correspond sensiblement à 6 µg d'acide l-malique.

Résumé

Une méthode biologique de dosage de l'acide l-malique est proposée. Le CO_2 provenant de la décarboxylation quantitative de cet acide par un enzyme adaptatif apparu chez *Lactobacillus arabinosus*, est mesuré par la microméthode manométrique de WARBURG. Les conditions optima d'entretien et d'adaptation de cet organisme ont été étudiées. La technique de dosage a été précisée en vue de son application aux produits végétaux frais ou fermentés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) OCHOA (S.), MEHLER (A. H.), KORNBERG (A.). — Biosynthèse des acides dicarboxyliques par fixation de CO_2. Isolement et propriétés d'une enzyme de foie de pigeon catalysant la décarboxylation oxydative de l'acide l-malique. *J. Biol. Chem.*, **174**, 979, 1948.

(2) KORKES (S.) et OCHOA (S.). — Transformation adaptative du malate en lactate et fixation de CO_2 par *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, **176**, 463, 1948.

(3) OCHOA (S.), SALLES (V.), ORTIZ. — Biosynthèse des acides dicarboxyliques par fixation de CO_2. Synthèse de l'acide malique par réduction et décarboxylation de l'acide pyruvique. *J. Biol. Chem.*, **184**, 863, 1950.

(4) SALLES (V.) et OCHOA (S.). — Biosynthèse des acides dicarboxyliques par fixation de CO_2. *J. Biol. Chem.*, **187**, 849, 1950.

(5) BLANCHARD (M. L.), KORKES (S.), DEL CAMPILLO (A.), OCHOA (S.). — Rôle de la biotine dans le métabolisme de *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, **187**, 875, 1950.

(6) KORKES (S.), DEL CAMPILLO (A.), OCHOA (S.). — Isolement et propriétés de l'enzyme malique, adaptatif chez *Lactobacillus arabinosus*. *J. Biol. Chem.*, **187**, 891, 1950.

(7) IFLAND (P.) et SHIVE (N.). — L'inhibition de l'utilisation de l'acide aspartique dans la synthèse de l'enzyme malique adaptatif chez *Lactobacillus arabinosus*. **223**, 949, 1956.

(8) NOSSAL. — Decarboxylation de l'acide malique par *Lactobacillus arabinosus* *Biochem J.*, **49**, 407, 1951.

(9) NOSSAL. — Détermination du l-malate et du fumarate par décarboxylation malique de *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem. J.*, **50**, 349, 1952.

(10) RENTHCHLER. — Un dosage biochimique de l'acide malique. *Travaux chimies aliment. hyg.*, **39**, 30, 1948.

OBSERVATIONS SUR L'UTILISATION D'UN ÉLECTROPHOTOMÈTRE POUR L'ÉTUDE DE LA CROISSANCE DES LEVURES [1]

PAR

P. GALZY

Laboratoire de recherches de Technologie,
Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale d'Agriculture, Montpellier.

PLAN DU MÉMOIRE

Introduction.
I. — Conditions d'utilisation.
II. — Modifications de l'appareil.
III. — Étalonnage.
IV. — Détermination du taux de croissance d'une levure.
V. — Conclusion.

Introduction.

La détermination des coefficients de croissance d'une levure dans des conditions de milieu déterminées peut s'effectuer en suivant l'évolution dans la culture soit du nombre de cellules, soit du poids de matière sèche. La numération des cellules vivantes capables de se reproduire permet de juger de la vitalité de la culture mais ne constitue pas une mesure exacte de la quantité de matière vivante formée. La numération directe des corps microbiens à l'hématimètre donne une détermination exacte de la croissance exprimée en nombre d'individus. Cette méthode n'exprime l'accroissement de matière vivante de la culture que si la taille des individus ne varie pas au cours de la croissance. En définitive, la matière sèche est la meilleure façon d'exprimer la quantité de matière vivante. On appelle

(1) Ce travail a été effectué au Laboratoire de Génétique physiologique du C. N. R. S.

« taux de croissance » le nombre de duplications de la quantité de matière sèche à l'heure ; si la taille des individus ne varie pas au cours de la croissance, le taux de croissance correspond au nombre de divisions cellulaires par heure.

MONOD a défini (1) six phases successives pour la croissance des cultures bactériennes :

— la phase de latence (croissance nulle) ;
— une phase d'accélération du taux de croissance ;
— une phase de croissance à taux constant (phase exponentielle) ;
— une phase de ralentissement du taux de croissance ;
— une phase à taux de croissance nul ;
— une période de décroissance.

Ces divers stades de la croissance se retrouvent pour les cultures de levures.

Dans la plupart des cas, il suffit de déterminer le temps de latence et le taux de croissance durant la phase exponentielle pour définir le comportement d'une souche de levures dans les conditions de milieu déterminées. Dans ce cas, on entend par temps de latence, l'ensemble des deux premières phases (croissance nulle et accélération du taux de croissance). Il est possible de suivre la croissance de la culture par l'évolution de sa densité optique mesurée à l'électrophotomètre.

Chaque mesure oblige à effectuer un prélèvement stérile dans la culture. Si ces prélèvements sont nombreux, les conditions de croissance de la levure s'en trouvent modifiées.

Nous avons essayé de mettre au point une technique de mesure qui évite ces prélèvements.

Nous avons pris comme exemple l'électrophotomètre de Meunier ; les conditions d'utilisation de cet appareil pour l'étude de la croissance des levures ont été déterminées par TAVLITZKI (2).

I. — Conditions d'utilisation

L'électrophotomètre de Meunier a été utilisé par TAVLITZKI dans les conditions suivantes:

— diaphragme précédant la cuve, réglé à 2 mm ;
— écran jaune (maximum de transmission à 546 mμ) ;
— cuve rectangulaire de 10 mm d'épaisseur à traversée horizontale.

Les mesures sont exprimées en unités arbitraires (division du tambour de l'électrophotomètre) : 100 divisions correspondent à une densité optique de 0,30 et à une teneur en matière sèche de 50 mg par litre. Ce dernier résultat est valable aussi bien pour la souche 59 R (3) utilisée par TAVLITZKI que pour la souche 276/3 br (4) citée plus loin.

Les mesures ne sont possibles que dans les limites où le nombre

de divisions du tambour est proportionnel à la concentration en matière sèche de la suspension de levure. TAVLITZKI a montré que cette condition n'était réalisée qu'entre 0 et 80 divisions.

Enfin il a été vérifié que la taille des levures ne varie pas au cours de la croissance. Nous avons déterminé pour la levure 59 R le rapport entre la concentration en cellules et la teneur en matière sèche à divers stades de la croissance (tableau I). Ces contrôles ont été effectués en milieu liquide à base de glucose (0,5 p. 100) et Yeast extract Difco (0,5 p. 100).

TABLEAU I

D. O. de la culture	228	745	1 277
Rapport	82	83	92

Le rapport, exprimé en millions de cellules de levure par mg de poids sec, ne varie pratiquement pas au cours de la croissance.

II. — Modifications de l'appareil

La mesure d'une densité optique au Meunier dans ces conditions oblige à effectuer un prélèvement stérile dans la culture. Il faudra aussi diluer les suspensions avant de les mesurer pour les fortes densités optiques. Une transformation de l'appareillage a été recherchée pour permettre d'effectuer des mesures en tube [1]. Un cube métallique (fig. 1) est placé sur le chariot du Meunier. Il permet de placer un tube à essais de 14 mm sur le trajet des rayons lumineux, le tube est maintenu en place par deux petits ressorts.

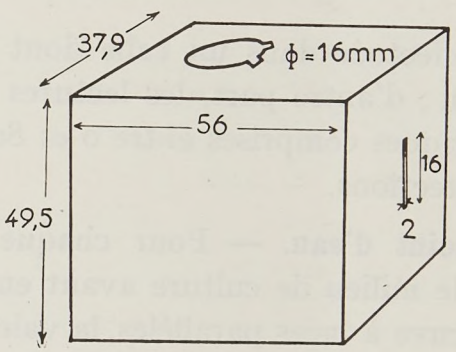


FIG. 1

La culture est effectuée à 25°, avec agitation (100 oscillations par minute ; amplitude 5 cm) dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume.

[1] Nous remercions Mr BATON, mécanicien à l'Institut de Biologie physio-chimique qui a bien voulu réaliser cet appareil.

Ce système assure une bonne aération du milieu et évite la sédimentation des cellules. On utilise des erlenmeyers de 100 ml munis d'un diverticule latéral (fig. 2). Ce diverticule est un tube à essai de 14 mm de diamètre.

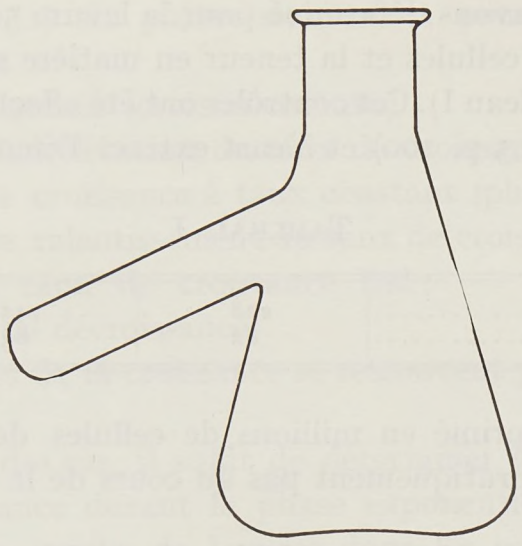


FIG. 2

Au moment de chaque mesure, il suffit de faire passer la culture dans le diverticule latéral pour faire une lecture directe.

III. — Étalonnage

La mesure est effectuée dans un tube dont le diamètre n'est pas rigoureusement connu ; d'autre part, les lectures ne sont correctes que pour des densités optiques comprises entre 0 et 80. Ces mesures exigent en principe trois corrections.

a) **Mesure du point d'eau.** — Pour chaque tube, une lecture à blanc est faite avec le milieu de culture avant ensemencement. Comme pour les mesures en cuve à faces parallèles, la valeur trouvée sera retranchée de toutes les mesures effectuées par la suite. Les tubes n'étant pas parfaitement réguliers, la valeur de cette correction varie avec la position du tube dans l'appareil : sur chaque tube, une marque est donc gravée permettant d'effectuer toutes les lectures dans la même position.

Il est souhaitable que la position de la marque soit choisie au point correspondant à la plus faible absorption de la lumière par le tube.

b) **Loi de Beer Lambert.** — D'après la loi de Beer Lambert, la densité optique est proportionnelle à la concentration des molécules absorbantes et à l'épaisseur de la solution traversée. Dans le cas particulier des suspensions de levures, nous avons vu qu'il n'y a plus proportionnalité entre concentration et densité optique pour les lectures supérieures à 80. Il est possible d'effectuer une courbe d'étalonnage à l'aide de dilutions

connues d'une suspension de levures. La densité optique de la suspension est mesurée grâce à une dilution convenable ayant une densité optique comprise entre 50 et 80 unités Meunier. Pour toutes les dilutions faites, on aura la valeur exacte calculée de la densité optique et la valeur mesurée directement au Meunier.

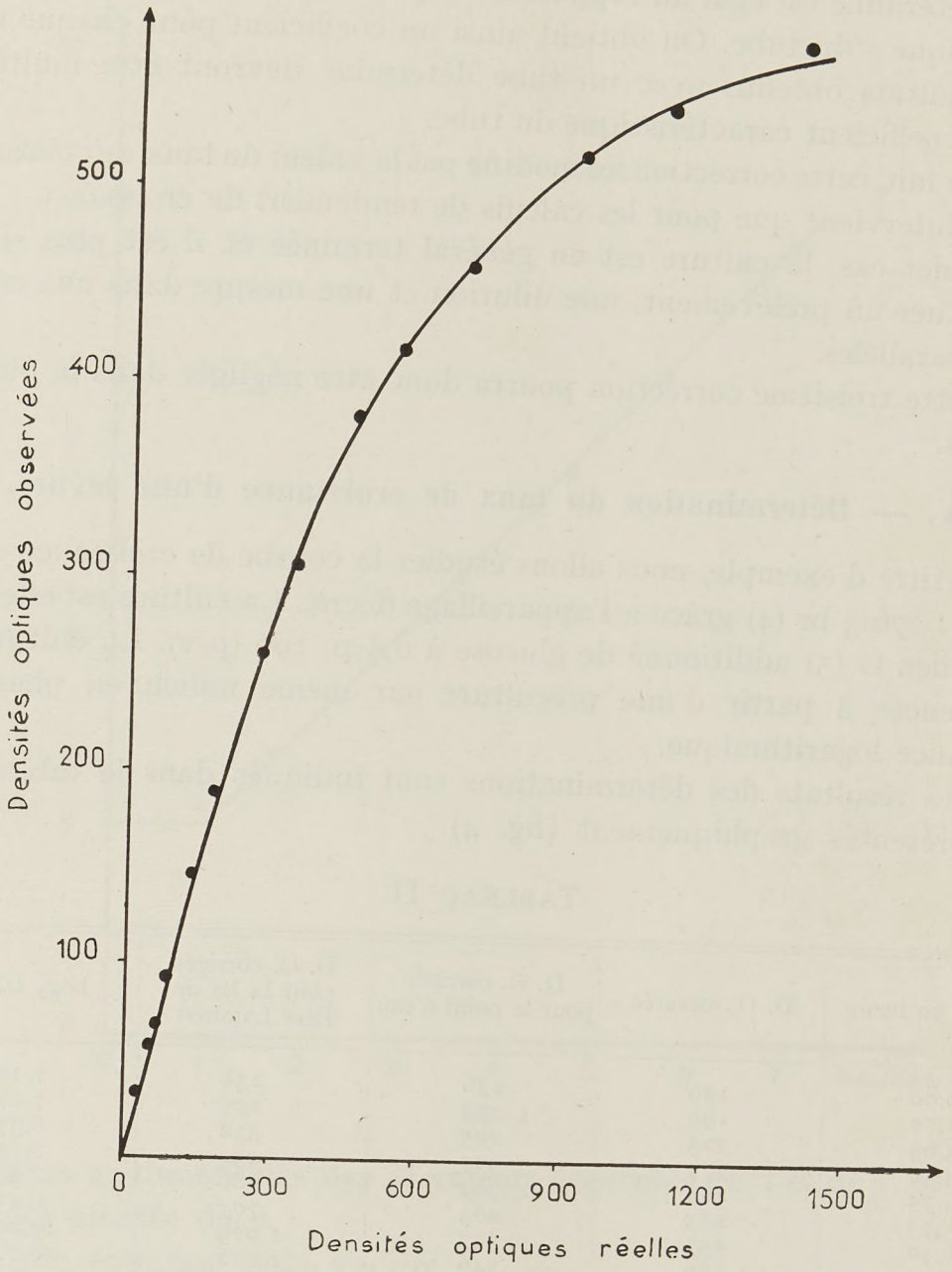


FIG. 3

Une courbe d'étalonnage a été ainsi tracée (fig. 3) : les densités optiques réelles sont portées en abscisses, les densités optiques mesurées en ordonnées. Un étalonnage particulier doit être effectué pour chaque souche de levure étudiée.

Les mesures servant à tracer la courbe sont toutes faites dans une cuve à faces parallèles.

c) **Correction de diamètre.** — La cuve à faces parallèles a 1 cm d'épaisseur. Le diamètre des tubes est variable et difficile à déterminer. Un terme correctif doit donc être appliqué. Une suspension de levures est mesurée à la fois dans une cuve à faces parallèles et dans les tubes à calibrer. Le rapport entre les densités optiques trouvées dans la cuve et dans un tube déterminé est égal au rapport de l'épaisseur de la cuve au diamètre « théorique » du tube. On obtient ainsi un coefficient pour chaque tube. Les résultats obtenus avec un tube déterminé devront être multipliés par le coefficient caractéristique du tube.

En fait, cette correction ne modifie pas la valeur du taux de croissance. Elle n'intervient que pour les calculs de rendement de croissance : dans ce dernier cas, la culture est en général terminée et il est plus simple d'effectuer un prélèvement, une dilution et une mesure dans une cuve à faces parallèles.

Cette troisième correction pourra donc être négligée dans la plupart des cas.

IV. — Détermination du taux de croissance d'une levure.

A titre d'exemple, nous allons étudier la courbe de croissance d'une levure : 276/3 br (4) grâce à l'appareillage décrit. La culture est effectuée sur milieu G (5) additionné de glucose à 0,5 p. 100 (p/v). La culture est ensemencée à partir d'une préculture sur même milieu en phase de croissance logarithmique.

Les résultats des déterminations sont indiqués dans le tableau II et représentés graphiquement (fig. 4).

TABLEAU II

Temps en heure	D. O. mesurée	D. O. corrigée pour le point d'eau	D. O. corrigée pour la loi de Beer Lambert	$\log_2$ D. O.
0,00	156	136	138	7,109
1,70	199	179	179	7,484
3,63	315	295	332	8,375
4,41	377	357	434	8,755
4,75	404	384	486	8,919
5,73	485	465	703	9,459
6,50	553	533	1 029	10,009
7,05	566	546	1 102	10,103

Sur le graphique, les temps exprimés en heure sont portés en abscisse et les logarithmes de base 2 des densités optiques, en ordonnées. Ce mode de représentation simplifie les calculs puisqu'un accroissement d'une unité en ordonnée correspond au doublement de la densité des cultures.

Le taux de croissance est alors défini par la relation :

$$N = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}.$$

La simple lecture du graphique permet de déterminer le taux de croissance (0,5 h^{-1}) et le temps de latence (1 heure). Ces déterminations par lecture directe du graphique peuvent être complétées par un calcul rigoureux. Il est possible de calculer l'équation linéaire de régression (6) pour les 7 points du graphique qui paraissent alignés. Soit $\bar{x}$ et $\bar{y}$ les

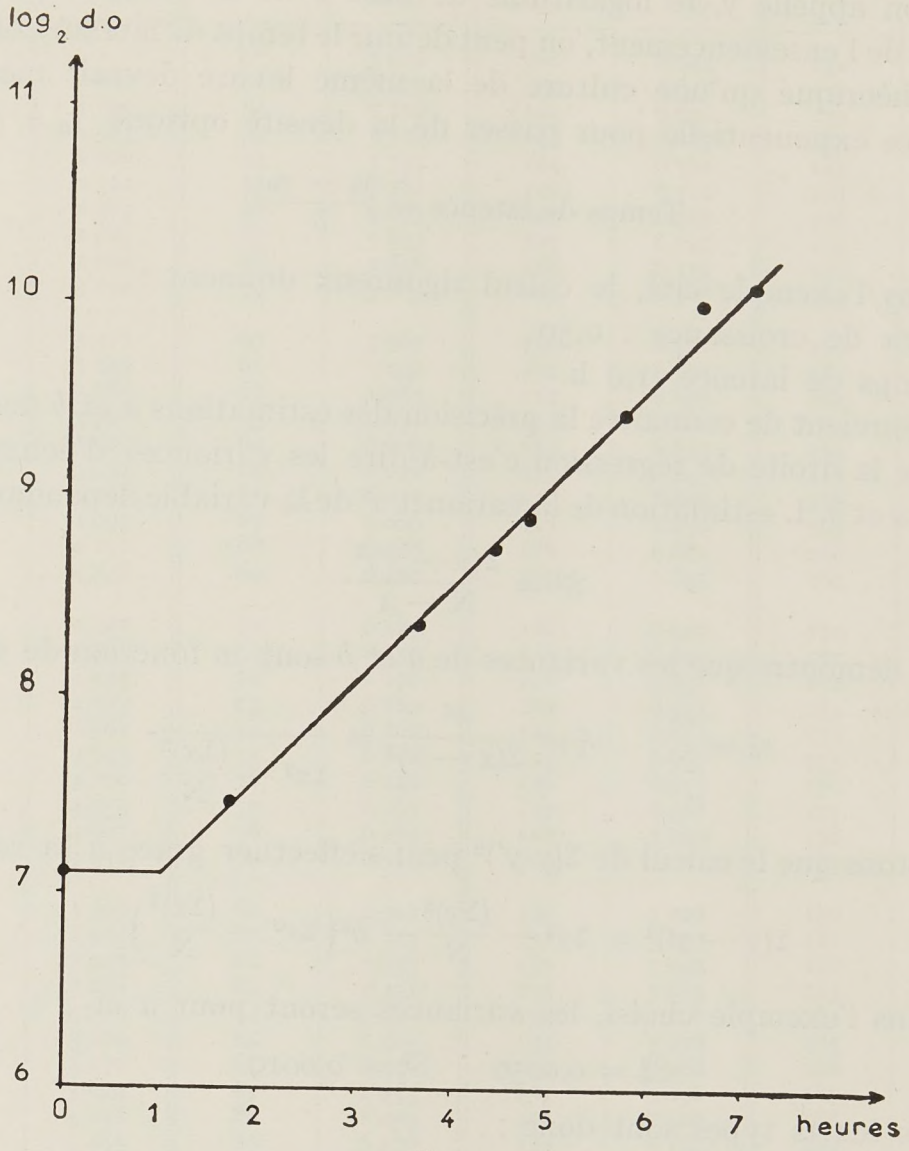


FIG. 4

moyennes arithmétiques des N valeurs observées de x et de y, et soit y' la valeur ajustée de y.

Cette équation peut s'écrire :

$$y' = a + b(x - \bar{x})$$

a et b étant des coefficients à déterminer en fonction des données. On démontre que :

$$a = \bar{y}$$

$$b = \frac{\Sigma y(x - \bar{x})}{\Sigma(x - \bar{x})^2} = \frac{\Sigma xy - \dfrac{\Sigma x \cdot \Sigma y}{N}}{\Sigma x^2 - \dfrac{(\Sigma x)^2}{N}}.$$

On appelle b coefficient de régression de y en x ; c'est la valeur, exprimée dans les unités choisies, du taux de croissance de la levure. La droite de régression coupe l'axe des ordonnées au point y_0 :

$$y_0 = a - b\bar{x}.$$

Si on appelle y_e le logarithme de base 2 de la densité optique au moment de l'ensemencement, on peut définir le temps de latence comme le temps théorique qu'une culture de la même levure devrait mettre en croissance exponentielle pour passer de la densité optique y_0 à y_e.

$$\text{Temps de latence} = \frac{y_e - y_0}{b}.$$

Dans l'exemple cité, le calcul rigoureux donnera :
Taux de croissance : 0,50.
Temps de latence : 1,0 h.

Il convient de connaître la précision des estimations a et b des coefficients de la droite de régression c'est-à-dire les variances d'échantillonnage de a et b. L'estimation de la variance σ^2 de la variable dépendante est :

$$S^2 = \frac{\Sigma(y - y')^2}{N - 2}.$$

On démontre que les variances de a et b sont en fonction de σ^2 :

$$\sigma_a^2 = \frac{\sigma^2}{N} \qquad \sigma_b^2 = \frac{\sigma^2}{\Sigma(x - \bar{x})^2} = \frac{\sigma^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}}.$$

Notons que le calcul de $\Sigma(y\text{-}y')^2$ peut s'effectuer grâce à la relation :

$$\Sigma(y - y')^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{N} - b^2\left(\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{N}\right).$$

Dans l'exemple choisi, les variances seront pour a et b :

$$S_a^2 = 0{,}0056 \qquad S_b^2 = 0{,}0019.$$

Les écarts types sont donc :

$$S_a = 0{,}075 \qquad S_b = 0{,}044.$$

L'équation de la droite de régression peut donc s'écrire :

$$y' = 6{,}60\ (\pm\ 0{,}075) + 0{,}50\ (\pm\ 0{,}044)x.$$

La comparaison des taux de croissances de deux levures s'effectuera comme la comparaison des moyennes de deux petits échantillons. On cherchera si les deux coefficients de régression b_1 et b_2 sont significativement différents en formant le rapport :

$$t = \frac{b_1 - b_2}{S_{(b_1 - b_2)}}$$

et en consultant la table de t à la ligne $(N_1 + N_2 - 4)$.

Log_2 *des nombres de* 1 *à* 200

	Log_2		Log_2		Log_2		Log_2
		50	5 644	100	6 644	150	7 230
1	0 000	51	5 679	101	6 658	151	7 238
2	1 000	52	5 700	102	6 672	152	7 248
3	1 585	53	5 728	103	6 687	153	7 257
4	2 000	54	5 754	104	6 701	154	7 267
5	2 322	55	5 781	105	6 714	155	7 276
6	2 585	56	5 807	106	6 728	156	7 285
7	2 807	57	5 833	107	6 742	157	7 294
8	3 000	58	5 858	108	6 755	158	7 304
9	3 170	59	5 883	109	6 768	159	7 313
10	3 322	60	5 907	110	6 781	160	7 322
11	3 459	61	5 931	111	6 794	161	7 331
12	3 585	62	5 954	112	6 807	162	7 340
13	3 700	63	5 977	113	6 820	163	7 349
14	3 807	64	6 000	114	6 833	164	7 358
15	3 907	65	6 022	115	6 845	165	7 366
16	4 000	66	6 044	116	6 858	166	7 375
17	4 090	67	6 066	117	6 870	167	7 384
18	4 170	68	6 088	118	6 883	168	7 392
19	4 248	69	6 109	119	6 895	169	7 401
20	4 322	70	6 129	120	6 907	170	7 409
21	4 392	71	6 150	121	6 919	171	7 418
22	4 459	72	6 170	122	6 931	172	7 426
23	4 523	73	6 189	123	6 943	173	7 435
24	4 585	74	6 209	124	6 954	174	7 443
25	4 643	75	6 229	125	6 966	175	7 451
26	4 700	76	6 248	126	6 977	176	7 459
27	4 755	77	6 267	127	6 988	177	7 468
28	4 807	78	6 285	128	7 000	178	7 476
29	4 858	79	6 303	129	7 011	179	7 484
30	4 907	80	6 322	130	7 022	180	7 492
31	4 954	81	6 340	131	7 033	181	7 500
32	5 000	82	6 357	132	7 044	182	7 508
33	5 044	83	6 375	133	7 055	183	7 516
34	5 086	84	6 392	134	7 066	184	7 524
35	5 129	85	6 409	135	7 076	185	7 531
36	5 170	86	6 426	136	7 088	186	7 539
37	5 209	87	6 443	137	7 098	187	7 547
38	5 248	88	6 459	138	7 109	188	7 555
39	5 285	89	6 476	139	7 119	189	7 562
40	5 322	90	6 492	140	7 129	190	7 570
41	5 358	91	6 508	141	7 140	191	7 578
42	5 392	92	6 524	142	7 150	192	7 585
43	5 426	93	6 539	143	7 160	193	7 593
44	5 459	94	6 555	144	7 170	194	7 600
45	5 492	95	6 570	145	7 180	195	7 607
46	5 524	96	6 585	146	7 190	196	7 615
47	5 555	97	6 600	147	7 200	197	7 622
48	5 585	98	6 615	148	7 210	198	7 629
49	5 615	99	6 629	149	7 219	199	7 637
	200 = 7,644				1 000 = 9,966		

Conclusion.

La croissance d'une levure peut être suivie en mesurant la densité optique de la culture ; cette détermination permet de calculer soit le poids sec, soit le nombre de cellules. Il est préférable de ne pas effectuer un trop grand nombre de prélèvements qui troubleraient la croissance. Le dispositif décrit permet de multiplier les mesures sans effectuer de prélèvements ; ce dispositif s'applique à l'électrophotomètre de Meunier ; son principe reste valable pour d'autres appareils du même type et peut être facilement adapté à chaque cas particulier.

Le taux de croissance et le temps de latence peuvent être déterminés directement par simple représentation graphique. La méthode de calcul indiquée donne des valeurs plus rigoureuses de ces paramètres et permet la comparaison des taux de croissance de plusieurs levures.

Reçu pour publication le 17 *octobre* 1958.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) Monod (J.). — Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Hermann. éd., 1941.
(2) Tavlitzki (J.). — Étude de la croissance des mutants « petite colonie ». Ann. de l'Institut Pasteur, **76**, p. 497. 1949.
(3) Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Chimenes (A. M.). — La mutation « petite colonie ». *Annales de l'institut Pasteur*, **76**, p. 351. 1949.
(4) Ephrussi (B.), Hottinguer (H.) et Chimenes (A. M.). — Étude génétique du mutant « petite colonie ». *Ann. de l'Institut Pasteur*, **76**, p. 419, 1949.
(5) Galzy (P.) et Slonimski (P.). — Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. Comptes rendus Académie des Sciences, **245**, p. 2423 1957.
(6) Vessereau (A.). — Méthodes statistiques en biologie et en agronomie. Baillère et fils éditeurs. Paris, 1948.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1958

I. — MÉMOIRES ORIGINAUX

Deibner (**L.**) et **Rifai** (**H.**). — Variation de l'indice des substances volatiles des jus de raisin au cours de leur conservation 5
Deibner (**L.**), **Rifai** (**H.**) et **Flanzy** (**M.**). — Substances colloïdales des jus de raisin — influence des différents modes de conservation sur leur stabilité 21
Nègre (**E.**), **Dugal** (**A.**) et **Évesque** (**J. M.**). — Dosage de l'acide tartrique sous forme de bitartrate de potassium dans les moûts et les vins 31
Deibner (**L.**) et **Bénard** (**P.**). — Emploi des alginates pour la déferrisation des vins 103
Bénard (**P.**), **André** (**P.**) et **Deibner** (**L.**). — Influence du mode d'alcoolisation et de la nature des alcools sur la qualité des vins doux naturels 111
Auclair (**J. E.**) et **Portmann** (**A.**). — Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. Effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de lactobacillus lactis..... 129
Poisson (**Mme J.**). — Sur la microflore bactérienne des pains de levure pressée de boulangerie 151
Ournac (**Mlle A.**). — Évolution de la vitamine C dans le raisin conservé en frigorifique 167
Bourdet (**A.**) et **Hérard** (**J.**). — Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins..... 177
Sudraud (**P.**). — Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges 203
Sudraud (**P.**) et **Cassignard** (**R.**). — Influence de certaines conditions dans la vinification en rouge..... 209
André (**P.**). — Abaque pour la détermination du degré alcoolique par la méthode chimique 217
Jacquin (**P.**). — Le calcium et le magnésium dans les pommes et les poires et dans les produits cidricoles..... 229
Jacquin (**P.**). — Le fer et le cuivre dans les pommes et les poires et dans les produits cidricoles 259
Lafon-Lafourcade (**Mme S.**) et **Peynaud** (**E.**). — L'acide P. aminobenzoïque, l'acide ptéroylglutamique et la choline (vitamine du Groupe B) dans les vins..... 303
Flanzy (**M.**) et **Loisel** (**Mlle Y.**). — Évolution des pectines dans les boissons et production du méthanol 311
Carles (**J.**), **Lamazou Betbeder** (**Mlle M.**), **Pech** (**Mme R.**), **Schiavon** (**Mme S.**). — Les acidités du vin et leur titration..... 323

Bure (**J.**). — Le problème rhéologique des industries de céréales.... 345
Dupuy (**P.**). — Les conditions d'oxydation de l'acide acétique par Acetobactor Rancens 367
Flanzy (**M.**), **Poux** (**Ch.**). — Les possibilités de la microvinification application à l'étude de la macération..... 377
Bidan (**P.**) et **André** (**L.**). — Sur la composition en acides aminés de quelques vins 403
Léglise (**M.**) et **Michel** (**A.**). — Le déferrage partiel des vins blancs par le Phytate de calcium 433
Rosset (**R.**) et **Dupuy** (**P.**). — Détermination de l'acide l-Malique dans les boissons fermentées par décarboxylation enzymatique..... 441
Galzy (**P.**). — Observations sur l'utilisation d'un électrophomètre pour l'étude de la croissance des levures 453

II. — CHRONIQUES DES LIVRES

Brémond (**E.**). — Techniques modernes de vinification 225
Ferre (**L.**). — Traité d'œnologie Bourguignonne..... 335
Lafon (**R.**), **Lafon** (**J.**) et **Couillaud** (**P.**). — Le Cognac, sa distillation 339

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 5-2-1959.
Dépôt légal: 1er trimestre 1959 *N° d'impression: 276*